

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
MARTIN NADEAU B. Sc.

ISOLATION ET EVALUATION DE MYCETES POUR LE CONTROLE BIOLOGIQUE DES
MOUSTIQUES (DIPTERA: CULICIDAE) ET DES SIMULIES
(DIPTERA: SIMULIIDAE) EN ZONE TEMPEREE.

SEPTEMBRE 1990

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RESUME

Deux souches des mycètes Culicinomyces clavisporus et une souche de Tolypocladium cylindrosporum sont évaluées au laboratoire et sur le terrain, à partir de séries d'essais biologiques, pour contrôler les moustiques (Diptera: Culicidae) et simuliés (Diptera: Simuliidae) de climat tempéré. Les mycètes C. clavisporus et T. cylindrosporum sont des pathogènes d'Aedes triseriatus. Les concentrations limites pour obtenir des mortalités intéressantes sont de l'ordre de 10^5 - 10^6 spores/ml pour les deux espèces de mycètes. Des différences dans les mortalités larvaires sont notées pour les deux souches de C. clavisporus; Ae. triseriatus étant moins résistante à la souche UAMH que celle de l'ATCC. A partir d'essais biologiques effectuées à 20 et 25° C, on observe une diminution de la pathogénicité de C. clavisporus (ATCC) avec l'augmentation de la température. T. cylindrosporum est également pathogène envers Ae. triseriatus. Dans nos essais, les blastoconidies sont plus virulentes que les conidies. La souche est pathogène pour tous les stades de moustiques et à toutes les températures évaluées (15, 18 et 25° C). En plus un ou des métabolite(s) toxique(s) pour les moustiques sont produits en bouillon de culture. T. cylindrosporum est également pathogène envers Simulium vittatum et Simulium corbis. C'est la première fois que des mortalités chez des simuliés sont mentionnées pour cette espèce de mycète. Chez les moustiques des mortalités intéressantes sont obtenues en laboratoire et sur le terrain avec des

temps de contact de 15 et de 30 minutes. Egalement des travaux de prospection à la Réserve faunique du St-Maurice, ont permis d'isoler différentes souches mycéliennes à partir d'oeufs, de larves et d'adultes de simulies. Des isolats des genres Acremonium, Fusarium, Saprolegnia, Mortierella, Ascochyta et Phoma sont obtenus sur des milieux de culture synthétiques. Des essais biologiques avec certaines souches sont réalisés pour vérifier le pouvoir pathogène de certaines d'entre elles sur moustiques et simulies. Parmi les isolats, le filtrat de culture d'une Acremonium sp. donne des résultats intéressants sur moustiques. De plus de ces prospections, trois espèces d'Entomophthorales, Erynia conica, Erynia sp, et Conidiobolus sp. sont isolées d'adultes de simulies et mises en culture. La découverte pendant deux années consécutives d'épizooties à Entomophthorales chez des adultes de simulies, nous porte à croire que ce groupe de mycètes est établi dans les populations de simulies de la Réserve faunique du St-Maurice.

REMERCIEMENTS

Ce travail est avant tout le fruit d'une collaboration entre l'auteur et certaines gens, à qui l'auteur exprime sa reconnaissance.

Au Dr. Jacques Boisvert, le directeur de ce mémoire, pour l'avoir initié à la recherche et au monde scientifique. Sa patience, sa compréhension et sa disponibilité envers l'auteur ont été de tout instant.

Aux Dr. Guy Charpentier et Alain Maire du département de Chimie-Biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières, ainsi qu'à Mesdames Liette Laganière et Sylvie Jacob, Messieurs Daniel Desmarteaux, Gilles Ducros et Yves Gagnon, pour leur aide, assistance et commentaires très appréciés.

Aux Dr. Alain Vey, de la Station de Recherche de Pathologie Comparée, INRA, St-Christol les Alès, France, et John Bissett, du Centre de Recherche en Biosystématique, Ottawa, Canada, pour l'identification des isolats mycéliens.

Aux Dr. Bernard Papierok et Paul Brey, de l'Unité de Lutte Contre les Insectes, Institut Pasteur, Paris, pour leur accueil chaleureux, leurs conseils et enseignements, qui ont été d'un grand recours entre autre pour l'isolement et

la mise en culture des mycètes entomopathogènes, ainsi que pour l'identification des Entomophthorales.

Finalelement, l'auteur remercie le fond F.C.A.R. pour son soutien financier.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRES	
I. MATERIEL ET METHODE	14
I.1 Evaluation de la virulence des trois mycètes entomopatho- pathogènes pour le contrôle des moustiques et des simuliés de climat tempéré	15
I.1.1 Choix et description des mycètes	15
I.1.2 Maintenance des souches et production des structures infectieuses	19
I.1.3 Essais biologiques sur moustiques	22
I.1.3.1 Espèce cible	22
I.1.3.2 Développement larvaire d' <u>Aedes triseriatus</u>	23
I.1.3.3 Viabilité des structures infectieuses	25
I.1.3.4 Essais biologiques	27

I.1.3.5 Influence de la température	29
I.1.3.6 Influence du stade larvaire	29
I.1.3.7 Evaluation des blastoconidies.....	30
I.1.3.8 Temps de contact.....	30
I.1.3.9 Filtrats des bouillons de culture	32
I.1.4 Essais biologiques en laboratoire sur simules	33
I.1.4.1 Espèce cible	33
I.1.4.2 Essais biologiques	34
I.1.5 Essais biologiques sur le terrain sur simules	40
I.1.5.1 Le système expérimental	40
I.2 Isolation et évaluation de la virulence de mycètes prove-	
nant d'oeufs, de larves et d'adultes de simules	44
I.2.1 Découverte des mycoses	45
I.2.2 Isolation des souches	47
I.2.3 Evaluation de la virulence	52
I.2.3.1 Culture et description des souches isolées	52
I.2.3.2 Production et viabilité des conidies	53
I.2.3.3 Essais biologiques sur moustiques	54
I.2.3.4 Essais biologiques sur le terrain sur simules	55
I.2.3.4.1 Production de masse des conidies	55
II. RESULTATS.....	57
II.1 Evaluation des souches de <u>Culicinomyces clavisporus</u>	57
II.1.1 Essais biologiques sur <u>Aedes triseriatus</u>	57
II.1.1.1 Influence de la température	58
II.2 Evaluation de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	59

II.2.1 Essais biologiques sur <u>Aedes triseriatus</u>	59
II.2.1.1 Les conidies	60
II.2.1.1.1 Influence de la température	60
II.2.1.1.2 Influence du stade larvaire	61
II.2.1.2 Les blastoconidies	63
II.2.1.2.1 Influence du temps de contact	63
II.2.1.3 Le filtrat de culture	65
II.2.2 Essais biologiques sur simuliés	65
II.2.2.1 Essais en laboratoire sur <u>Simulium vittatum</u>	66
II.2.2.2 Essais sur le terrain sur <u>Simulium corbis</u>	67
II.3 Isolation des mycètes provenant d'oeufs, de larves et d'a-	
dultes de simuliés	68
II.3.1 Essais biologiques sur <u>Aedes triseriatus</u>	69
II.3.2 Essais biologiques sur <u>Simulium corbis</u>	70
II.3.3 Epizooties à Entomophthorales	71
III. DISCUSSION	111
III.1 Pathogénécité de <u>Culicinomyces clavisporus</u>	111
III.2 Pathogénécité de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	113
III.3 Pathogénécité des souches isolées d'oeufs, de larves et	
d'adultes de simuliés.....	124
III.4 Variabilité des essais biologiques	126
III.5 Epizooties à Entomophthorales	127
REFERENCES	131
ANNEXES	150
A. Composition et préparation des milieux de culture	150

B. La formule d'Abbott (1925)	154
-------------------------------------	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1. Augmentation du nombre d'espèces d'insectes résistants durant la décennie 1971-1980	5
2. Développement larvaire d' <u>Aedes triseriatus</u> . Pourcentage moyen des différents stades en fonction du temps	26
3. Nom et provenance des différentes souches de mycètes isolées de simuliés	74

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. Système de maintenance des larves de simuliés	35
2. Bécher pour les essais biologiques en laboratoire	38
3. Système de gouttières, pour les essais biologiques sur le terrain envers les simuliés	41
4. Différentes phases de la préparation, aux fins d'étude d'un insecte mort d'entomophthorose	49
5. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Culicinomyces clavisporus</u> (UAMH)	75
6. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Culicinomyces clavisporus</u> (ATCC)	75
7. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Culicinomyces clavisporus</u> , (ATCC), à 20 ⁰ C	77
8. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Culicinomyces clavisporus</u> , (ATCC), à 25 ⁰ C	77
9. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindro-</u>	

<u>sporum</u>	79
10. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u> , à 18 ⁰ C	81
11. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u> , à 20 ⁰ C	81
12. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u> , à 25 ⁰ C	83
13. Mortalité des larves de 1 ^{er} stade d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	85
14. Mortalité des larves de 2 ^{ième} stade d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	85
15. Mortalité des larves de 3 ^{ième} stade d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	87
16. Mortalité des larves de 4 ^{ième} stade d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	87
17. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes concentrations de blastoconidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	89

18. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> à différents temps d'exposition, dans une suspension de $1,6 \times 10^6$ blastoconidies/ml de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	91
19. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> à différents temps d'exposition, dans une suspension de $1,6 \times 10^7$ blastoconidies/ml de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	91
20. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes dilutions d'un filtrat de culture de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	93
21. Mortalité des larves de <u>Simulium vittatum</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u> (préliminaire)	95
22. Mortalité des larves de <u>Simulium vittatum</u> exposées à différentes concentrations de conidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	97
23. Mortalité des larves de <u>Simulium vittatum</u> exposées à différentes concentrations de blastoconidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	97
24. Mortalité des larves de <u>Simulium corbis</u> exposées à deux doses de blastoconidies de <u>Tolypocladium cylindrosporum</u>	99
25. Mortalité des larves d' <u>Aedes triseriatus</u> exposées à différentes dilutions d'un filtrat de culture de 6J	101
26. Carte de la Réserve faunique du St-Maurice	103
27. Trois sites de récolte de simuliés adultes atteints d'entomophthorose	105

28. Substrats sur lesquels des simuliés adultes furent récoltés ...	107
29. Simulie atteinte d'entomophthorose	109

INTRODUCTION

Les moustiques (Diptera: Culicidae) et les simuliés (Diptera: Simuliidae) s'attaquent à l'homme et aux autres vertébrés. Chez la plupart des espèces, les adultes femelles vont piquer le vertébré et prélever une quantité de sang qui est utilisée en partie pour la nutrition, mais surtout pour la maturation des oeufs. Certaines femelles peuvent effectuer plusieurs repas sanguins sur des hôtes différents. Lors d'un repas sanguin, ces insectes hématophages peuvent transmettre un grand nombre d'organismes: bactéries, protozoaires, virus et helminthes, dont certains peuvent être pathogènes pour l'hôte (Lacey et Undeen, 1986). On parle alors de vecteurs, c'est à dire d'organismes qui assurent la transmission biologique (ou mécanique) active d'un agent infectieux, d'un vertébré à un autre vertébré (Rodhain et Perez, 1985).

Sous les tropiques, ces vecteurs sont responsables de l'expansion de graves maladies humaines telles la malaria, les filarioses, la dengue, l'onchocercose, etc. Au Canada, les plus importants pathogènes transmis par les diptères piqueurs sont les arbovirus, qui se retrouvent chez l'homme et/ou le bétail, lorsque les populations d'insectes piqueurs deviennent anormalement élevées. Certains de ces virus causent des encéphalites; celle de l'ouest (WEE), du lièvre américain (SSH), de l'est (EEE) et celle de St-Louis (SLE) (Wood, 1985). En général, la plupart des personnes atteintes d'une de ces infections,

ne souffrent pas d'effets graves et peuvent même ignorer qu'elles ont l'infection.

On peut également développer des allergies aux piqûres. Chaque fois qu'un diptère piqueur prend un repas sanguin, il injecte une petite quantité de fluide salivaire pour prévenir la coagulation. Ce fluide contient des substances allergènes, généralement de type protéique, responsables de la démangeaison et de l'oedème au site de la piqûre. Chez des individus hypersensibles, une réaction anaphylactique bien que rare, peut se produire. Une émergence massive de Simulium arcticum Malloch a entraîné la mort par réaction allergique, de nombreux animaux dans certaines régions à proximité des rivières Saskatchewan et Athabaska (Canada) (Wood, 1985).

En plus des problèmes d'ordre médical, la présence des moustiques et des simules cause des pertes importantes sur le plan économique. Par leurs attaques massives et acharnées, elles affectent la production laitière et le poids des animaux. Ceux-ci sont excités et ne peuvent paître tranquillement (Wood, 1985).

Cette nuisance peut provoquer chez les humains, une diminution du temps alloué aux activités de plein-air (randonnée, pêche, chasse, camping, cueillette, etc.), et donc une baisse de fréquentation des bases, centres, parcs et autres lieux de villégiature. Les activités forestières ainsi que le développement de certaines régions, par exemple le nord québécois, n'échappent pas non plus aux problèmes causés par la pullulation des diptères piqueurs.

Pour des raisons économiques et de santé, il devient donc nécessaire de diminuer les populations de moustiques et de simuliés. Au Canada, plusieurs agglomérations et territoires possèdent actuellement des programmes de lutte contre les moustiques et les simuliés. A l'échelle mondiale, il existe plusieurs programmes majeurs dont certains couvrent plusieurs pays. La base de la stratégie de contrôle des diptères vecteurs, qui consiste à réduire suffisamment les populations, de manière à restreindre les infestations par l'application d'insecticides, remonte au début de la seconde guerre mondiale. En 1939, le chimiste Paul Muller découvre le pouvoir insecticide du DDT. C'est le premier insecticide vraiment efficace dans la lutte antivectorielle. Sa découverte inestimable a permis entre autre, d'enrayer le paludisme (malaria) dans certaines régions du globe. Dès lors, naissait la possibilité de faire la synthèse de composés insecticides efficaces, simples et peu coûteux, pour les utiliser dans des programmes de lutte des espèces vectrices de maladies. Entre autre de 1940-1950, on assiste au développement des insecticides organophosphorés et des carbamates (Flint et Van den Bosch, 1981).

Pour lutter contre les moustiques et les simuliés de façon efficace, on utilise des insecticides qui tuent les stades larvaires, c'est à dire des larvicides. Il est difficile d'appliquer des insecticides au niveau des adultes à cause de leur pouvoir de dispersion qui répartit les populations dans de nombreux endroits plus ou moins accessibles à l'insecticide. Par contre, les larves sont beaucoup moins mobiles et présentent donc une cible plus vulnérable, et bien

sûr en diminuant le nombre de larves, on réduit l'émergence et par le fait même, les populations d'adultes.

Malheureusement, la lutte avec des larvicides chimiques a entraîné certains problèmes. Dès 1947, des rapports font mention de la résistance au DDT, chez la mouche domestique et Culex molestus (Brown et Pal, 1973). D'année en année, la résistance au DDT s'accroît et s'étend à d'autres composés. Le tableau 1 présente les résultats de cette prolifération de la résistance, durant la décennie 1971-1980. On dénote plus de 400 espèces d'insectes manifestant une résistance aux différents groupes d'insecticides. Pour l'ensemble de cette décennie, le taux d'augmentation des espèces résistantes a plus que doublé, avec un maximum de 17 pour le groupe des carbamates. De plus, on verra apparaître le phénomène de la résistance croisée, c'est à dire que la résistance à un insecticide va entraîner la résistance à d'autres insecticides, et pas nécessairement du même groupe chimique (Fest et Smitdt, 1973, Brown, 1983).

En 1957, l'O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé), donnait la définition suivante de la résistance: "...l'apparition dans une population d'insectes, de la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce."

Lorsque l'on traite les mêmes espèces fréquemment et avec une dose unique d'un seul insecticide, certains individus de la population vont

Tableau 1
Augmentation du nombre d'espèces d'insectes résistants
durant la décennie 1971-1980.*

	1970	1980	taux d'augmentation
Espèces résistantes	224	428	1.91
Cas de résistance par groupe d'insecticide			
DDT	98	229	2.34
Cyclodiène	140	269	1.92
Organophosphoré	54	200	3.70
Carbamate	3	51	17.00
Pyréthrinoïde	3	22	7.33
Fumigant	3	17	5.67
Autres	12	41	3.42
Pour tous les groupes	313	629	2.65

* tiré de Georghiou et Mellon, 1983

survivre au traitement. Il y a donc sélection des individus résistants. Certains de ces derniers vont se reproduire en transmettant à leur génération cette résistance à l'insecticide, et ainsi les nouvelles populations ne seront composées que d'individus résistants. On a donc deux alternatives, soit qu'on change de produit ou bien qu'on augmente la dose. Si on change de produit, on finit par se retrouver avec une nouvelle résistance, parfois rapide et souvent multiple (résistance croisée). Si on augmente la dose, il y a risque d'étendre le spectre d'activité, donc perte de la spécificité. En fait, la résistance a contribué à la demande de plus en plus grandissante de nouveaux insecticides.

Deux autres problèmes ont surgi suite à l'utilisation d'insecticides chimiques; le manque de spécificité (atteinte à la faune non-cible et parfois bénéfique) et la persistance, qui a eu pour conséquence l'accumulation de résidus toxiques dans l'environnement. Cette pollution environnementale a porté atteinte à des écosystèmes autres que celui de l'espèce cible, et a touché la chaîne alimentaire. Le DDT en fournit un exemple célèbre. On l'a retrouvé chez les pingouins en Antarctique, des grenouilles boréales, des poissons des océans, le lait maternel, etc.

Les problèmes découlant de l'utilisation d'insecticides de synthèse, le développement d'une conscience environnementale de la population et l'augmentation des coûts de production de nouveaux composés chimiques, ont encouragé la recherche dans le domaine du contrôle biologique. On entend par contrôle ou lutte biologique, l'utilisation d'ennemis naturels des espèces cibles dans le but d'en diminuer les populations à des niveaux de tolérance acceptable. Par exemple, pour qu'un arthropode puisse avoir un rôle

significatif dans la transmission d'un pathogène, il faut que sa population soit suffisamment abondante. Il existe par conséquent une densité critique, au-dessous de laquelle la transmission ne peut avoir lieu (Rodhain et Perez, 1985). Il s'agit donc de contrôler et non d'exterminer les populations cibles. Il en va de même pour la nuisance causée par les populations de moustiques et de simulies; à une certaine densité des populations, on tolérera la présence de l'insecte.

Les insecticides biologiques doivent être économiques à produire et leur formulation doit être stable, c'est à dire conserver une activité toxique pour l'espèce hôte seulement. Idéalement l'insecticide devrait posséder une action rémanente, que l'on définit comme la persistance de l'activité toxique au point d'application, ce qui permettrait d'espacer les traitements et de réduire les coûts d'opération. Donc l'insecticide devrait s'établir dans la population d'insectes, sans nuire aux populations non cibles (spécificité). De fait, rares sont les insecticides qui possèdent toutes ces caractéristiques, mais toutefois ces particularités permettent de faire un choix entre les insecticides, en comparant les avantages et les inconvénients.

Une grande variété d'organismes, incluant les prédateurs, peuvent réduire le nombre de larves et d'adultes de moustiques et de simulies. Parmi les pathogènes de ces insectes, on trouve des nématodes, des protozoaires, des virus, des bactéries et des mycètes.

Les nématodes parasites de moustiques et de simulies sont des mermithides ou des filaires (Daoust, 1983c, Petersen, 1985, Molloy, 1987). Les recherches sur le contrôle biologique avec ce type d'organisme provient surtout des études réalisées avec l'espèce Romanomermis culicivora Ross et Smith (= Reesimermis nielsenii) Ces études mentionnent que cette espèce est bien adaptée au cycle de vie des moustiques, qu'elle est spécifique à son hôte, produit un taux d'infection élevé et qu'elle peut être rémanente. Cependant les coûts élevés de production, la diminution du pouvoir infectieux sous certaines conditions environnementales (matière en suspension, pH, température, salinité) et le développement d'une résistance en laboratoire de Culex quinquefasciatus Say limitent son utilisation pour le contrôle biologique (Brown et Platzer, 1977, Curran, 1982, Petersen, 1985, Holck, 1988).

On fait mention de plusieurs protozoaires chez les moustiques et les simulies (Daoust, 1983a, Clark, 1985, Fukuda, 1985, Lacey et Undeen, 1986, Molloy, 1987). Les protozoaires les plus communs et les plus étudiés pour le contrôle des simulies et des moustiques sont les microsporidies. Toutefois, le manque de connaissance sur les cycles biologiques et les systèmes dispendieux de production in vitro, font qu'il est peu probable à l'état actuel de nos connaissances, qu'ils servent un jour d'insecticide biologique (Hazard, 1985, Lacey et Undeen, 1986).

On retrouve plusieurs espèces de virus entomopathogènes chez les Culicidae et les Simuliidae (par exemple les virus de type polyédrie nucléaire et cytoplasmique). Cependant, il y a deux principales raisons qui font des virus

de mauvais candidats pour le contrôle biologique des diptères aquatiques. La première est leur faible pouvoir infectieux pour leur hôte original, et la seconde, est qu'il n'existe pas de méthodes économiques pour la production de masse des virions; donc un faible potentiel de commercialisation (Federici, 1985, Undeen et Lacey, 1986).

Toutefois, certaines bactéries ont déjà démontré leur capacité pour le contrôle biologique des diptères piqueurs. En 1976, une souche du pathogène bien connu Bacillus thuringiensis Berliner, était isolée de moustiques (Culex pipiens Linnaeus) morts provenant d'une mare en Israël (Margalit et Dean, 1985). Ce pathogène, subséquemment appelé Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis De Barjac (B.t.i.), est très spécifique aux larves de moustiques et de simules (Mulla et al, 1982). Le B.t.i. fut développé à un point tel, qu'il existe sur le marché différentes formulations de cet insecticide. On l'applique principalement pour le contrôle des moustiques et des simules. Entre autre on note sa contribution inestimable dans la lutte contre la "cécité des rivières" (onchocercose) en Afrique de l'Ouest (W.H.O., 1985). Depuis quelques années, on l'applique pour contrôler les populations de Culex, Anopheles, Aedes, et ainsi réduire l'incidence de diverses maladies; filariose, dengue, encéphalites et fièvre jaune (De Barjac, 1987).

Les résultats obtenus avec le B.t.i. ont encouragé l'étude d'un autre candidat, le Bacillus sphaericus Meyer & Neide. Comme le B.t.i., B. sphaericus tue son hôte grâce à une toxine protéique, produite lors de la sporulation de la bactérie. Il est intéressant de noter que les souches de B. sphaericus à

l'inverse du B.t.i. sont fortement toxiques pour les Culex et les Anopheles et peu pour les Aedes (De Barjac, 1987, Payne, 1988). Actuellement, des formulations commerciales pour contrôler les populations de moustiques à base de B. sphaericus, sont en développement (Payne, 1988).

Comme le B.t.i. est le plus important insecticide biologique commercial existant pour le contrôle des moustiques et des similies, on peut s'imaginer que son utilisation s'accroîtra dans les prochaines années, ce qui aura pour effet d'augmenter la pression de sélection et donc la possibilité de résistance des espèces traitées. D'où la nécessité de rechercher et de développer d'autres pathogènes des diptères piqueurs.

On connaît plus de 400 espèces de mycètes entomopathogènes (Hall et Papierok, 1982). Ceux affectant les diptères sont regroupés dans les classes suivantes: Chytridiomycètes, Oomycètes, Trichomycètes, Zygomycètes et Deutéromycètes, (Daoust, 1983b, De Barjac, 1987, Molloy, 1987, Papierok et Brey, 1989). La grande majorité se cultive sur des milieux artificiels, en général simples et peu dispendieux. Certains ont une distribution géographique mondiale; on a retrouvé Lagenidium giganteum Couch (Oomycètes) jusqu'en Antarctique (Lacey et Undeen, 1986). Il existe des formes aquatiques et terrestres, actives contre les insectes immatures (larves) et les adultes; en général elles ont une bonne spécificité envers leur hôte naturel. La spécificité chez les mycètes entomopathogènes se définit comme l'expression d'adaptations et d'affinités réciproques entre l'organisme pathogène et la totalité de son espèce hôte. (Fargues et Remaudière, 1977).

Les mycètes entomopathogènes ont également un pouvoir rémanent grâce à la production de structures infectieuses sur les cadavres (conidiospores chez les Deutéromycètes, zoospores chez les Oomycètes), pouvant provoquer une amplification naturelle de l'inoculum, ou par la formation de structures de conservation (spores durables chez les Entomophthorales), permettant la survie du champignon lors de conditions défavorables (absence d'hôte, sécheresse, froid).

Les espèces du genre Coelomomyces et celles de l'ordre des Entomophthorales provoquent des épizooties naturelles chez les larves et les adultes de diptères (Shemanchuk et Humber, 1978, Kramer, 1983, Dubitskii, 1985, Hywell-Jones et Ladle, 1986). L'introduction de certaines espèces sur le terrain a donné des résultats encourageants pour le contrôle de certaines populations de moustiques; l'introduction de Culicinomyces clavisporus Couch, Romney et Rao dans des cuvettes rocheuses a causé 100% de mortalité chez les larves d'Aedes rubrithorax Macquart; l'application de L. giganteum dans des rizières a causé plus de 90% de mortalité chez Culex tarsalis Coquillett (Frances et al, 1985b, Kerwin et Washino, 1987).

Les mycètes ont donc un potentiel considérable en ce qui concerne le contrôle des insectes et la réduction de la pollution environnementale causée par les insecticides chimiques. Malgré cela, il n'existe que deux formulations commerciales à base de pathogène fongique, le Metaquino produit au Brésil avec le mycète Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin, et le Vertalec,

produit en Angleterre avec Verticillium lecanii (Zimmermann) Viegas. Le Metaquino est utilisé pour contrôler les populations de punaises dans les champs de canne à sucre au Brésil et le Vertalec contre les pucerons s'attaquant aux plantes des verrières (Payne, 1988). Il n'y a aucune formulation commerciale contre les moustiques et les simules. On peut donc se demander quelles sont les raisons pouvant expliquer cette absence.

Il existe certains désavantages à l'utilisation des mycètes: entre autres, la complexité du cycle d'infection, le temps d'incubation de la mycose qui est généralement assez long, et la fragilité de certaines spores infectieuses (Papierok et Brey, 1989). On peut également mentionner que certaines espèces ne sont pas encore cultivées in vitro, par exemple celles du genre Coelomomyces. Chez d'autre comme L. giganteum, on assiste à une diminution du pouvoir infectieux après quelques repiquages sur des milieux de culture synthétique. On doit donc réaliser une série de passage chez les moustiques hôtes pour rétablir l'activité toxique du mycète (Lord et Roberts, 1986).

Jusqu'à présent, la grande majorité des travaux sur les mycètes entomopathogènes, ont été consacrés au domaine de l'agriculture (Hall et Papierok, 1982). Donc il y a peu de travaux consacrés à la prospection pour trouver des mycoses de diptères piqueurs, peu d'études écologiques pour évaluer les facteurs environnementaux et l'incidence à long terme des pathogènes sur les populations cibles, et peu de tests pour évaluer les mycètes entomopathogènes existants pour contrôler les diptères piqueurs. Si on désire un traitement à long terme, il faudra que le pathogène s'établisse dans les populations de moustiques et de simules et qu'il résiste aux conditions

environnementales du milieu, d'où la nécessité d'effectuer des prospections et de comprendre l'écologie des espèces utilisées comme insecticides. Des études plus nombreuses, comme celle réalisée par Goettel (1987b), en Alberta (Canada) sur l'incidence de pathogènes et de parasites de moustiques devront être réalisées.

Dans cette optique, cette étude se propose premièrement, d'évaluer certains mycètes entomopathogènes connus pour contrôler les moustiques et les simulies de climat tempéré. Deuxièmement, d'isoler des mycètes à partir d'oeufs, de larves et d'adultes de simulies morts de mycoses et d'évaluer le pouvoir larvicide de certaines souches sur moustiques et sur simulies.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODE

On a mentionné qu'au Canada comme dans bien d'autres régions du globe, il existait un besoin réel d'insecticides pour réduire à un niveau acceptable les populations d'insectes piqueurs, et que le développement et la recherche d'insecticides biologiques dans le domaine de la mycologie, méritaient une attention particulière.

Cependant, seulement quelques espèces de mycètes entomopathogènes ont vraiment été étudiées comme agent potentiel pour le contrôle des moustiques et des simulies. Dans cette première partie du travail, on décrira les techniques qui permettront de vérifier le pouvoir pathogène de certaines souches de mycètes et d'étudier certains paramètres affectant ce pouvoir.

On a également mentionné que la faible quantité d'espèces de mycètes pour le contrôle des diptères piqueurs s'expliquait entre autre, par un manque dans la prospection et l'isolation de souches. La deuxième partie décrira les méthodes d'isolation des mycètes à partir d'oeufs, de larves et d'adultes de simulies ainsi que les méthodes qui permettent de vérifier le pouvoir pathogène de trois isolats, sur moustiques et sur simulies.

I. 1 EVALUATION DE TROIS MYCETES ENTOMOPATHOGENES POUR LE CONTROLE DES MOUSTIQUES ET DES SIMULIES DE CLIMAT TEMPÉRE.

I. 1.1 CHOIX ET DESCRIPTION DES MYCETES.

Nous avons sélectionné trois souches de mycètes, deux de l'espèce Culicinomyces clavisporus et une de Tolyposcladium cylindrosporum Gams.

Le choix repose sur les avantages que possèdent ces trois souches pour le contrôle des diptères piqueurs au Canada. Les souches ont été isolées de diptères, et on peut les cultiver facilement sur des milieux synthétiques et peu coûteux. On a même isolé C. clavisporus au Canada (Goettel, 1987a). Ce sont des larvicides de moustiques qui conservent leur activité toxique à basse température (Sweeney et Panter, 1977, Frances et al, 1984, 1985a, Riba et al, 1986, Garner et Pillai, 1986, 1987, Goettel, 1987c). C. clavisporus serait également pathogène pour les larves de simulies (Sweeney, 1979a, Knight, 1980, Gaugler et Jaronski, 1983, Sweeney et Roberts, 1983) . Toutefois ce pouvoir pathogène reste obscur (Gaugler et Jaronski, 1983). Egalement, les deux espèces de mycètes ont un cycle de vie relativement simple et de plus elles sporulent à l'extérieur de la cuticule de l'insecte, d' où la possibilité d'un effet rémanent. De plus, après huit années et plus de 200 repiquages sur gélose, la souche australienne de C. clavisporus est demeurée pathogène pour les moustiques (Roberts et Panter, 1985).

Culicinomyces clavisporus appartient à la classe des Deutéromycètes. Cette classe contient les mycètes dont on ne connaît que le stade asexué. C'est pour cela que l'on utilise souvent les termes "mycètes imparfaits" pour parler des représentants de cette classe. Ce mycète fut découvert en Australie en 1972, infectant Anopheles amictus (Edwards), durant la même période, on l'isolait d'Anopheles quadrimaculatus Say aux Etats-Unis (Couch et al, 1974). En 1982, on le découvrit en Alberta (Canada), parasitant Culiseta inornata Williston (Goettel, 1987b).

En plus des espèces mentionnées ci-haut, C. clavisporus infecte les genres suivants: Aedes, Culex, Psorophora (Sweeney et al, 1983a, Roberts et Panter, 1985). Actuellement le mycète n'affecte, en majorité, que les larves de diptères aquatiques. Des tests d'inocuité chez des vertébrés (rats, souris, moutons, chats, cochons et canards) ont été négatifs (Egerton et al, 1978, Mulley et al, 1981). On obtient des résultats similaires chez les lézards, crapauds et abeilles (Mulley et al, 1981, Cooper et al, 1984).

Chez C. clavisporus la forme infectieuse est la conidie. La conidiogenèse s'amorce par la croissance de la cellule conidiogène, appelée phialide, sur les hyphes végétatifs. Les phialides sont des structures en forme de bouteille avec un col effilé, dont la croissance peut-être latérale ou terminale (Goettel, 1987a). A l'extrémité de la phialide, il y a formation des conidies (Inmann III et Bland, 1983). Les phialides et les conidies se développent seules ou en une touffe verticillée (Roberts et Panter, 1985). Les conidies (5-7,5 x 1,5-3 µm) sont ovées à la base et étroites à l'extrémité

(Goettel, 1987a). Des conidies ovales ($2-3 \times 2 \mu\text{m}$) sont observées dans les milieux de culture synthétiques (Sigler *et al.*, 1987).

Les conidies sont ingérées durant l'alimentation des larves de diptères aquatiques. Elles adhèrent à la partie antérieure ou postérieure du tractus alimentaire, grâce à une substance visqueuse qui facilite l'adhésion (Sweeney, 1975a, 1975b, 1981, Sweeney *et al.*, 1983b, Sweeney, 1985). Chaque spore développe un tube germinale, qui pénètre au travers des téguments et envahit l'hémocoel sous forme d'hyphes et de corps mycéliens. Ces derniers circulent dans l'hémolymph et certains vont germer et former de courts cordons (Sweeney, 1985), pendant que les hyphes cloisonnés bifurquent d'un bout à l'autre de l'hémocoel en tuant la larve (Sweeney, 1983). Après le mort de l'insecte, la cavité du corps se gonfle et les téguments se brisent (Roberts et Panter, 1985). A ce moment, les hyphes passent au travers de la cuticule et il y a formation de conidiophores et sporulation. Les sites les plus fréquents de la sporulation sont les segments abdominaux postérieurs (Cooper et Sweeney, 1986). En présence d'une forte concentration de conidies, l'invasion de la larve peut se faire au niveau des papilles anales (Sweeney, 1979b).

Tolypocladium cylindrosporum appartient également à la classe des Deutéromycètes. L'intérêt pour l'utilisation de ce mycète pour le contrôle biologique, remonte à son isolation en Californie (Etats-Unis) d' Aedes sierrensis Ludlow, et en Nouvelle-Zélande d' Aedes australis Erichson (Weiser et Pillai, 1981, Saunders *et al.*, 1988). En plus des diptères, certains éphémères, cladocères, copépodes et lépidoptères pourraient être des hôtes pour *T.*

cylindrosporum (Soares, 1982, Bissett, 1983, Gardner, 1984, Poprawski et al, 1985, Turlington et al, 1986, Gardner et Pillai, 1987, Lam et al, 1988).

Tolypocladium cylindrosporum produit deux types de structures infectieuses: la conidie et la blastoconidie. La conidie se retrouve lors de la croissance du mycète sur milieu gélosé, alors que la blastoconidie n'est produite qu'en bouillon de culture. Les conidies ($3,5 - 6,8 \times 1,2-1,9 \mu\text{m}$) qui naissent à l'extrémité des phialides, sont cylindriques, droites ou légèrement courbées, et aux extrémités arrondies (Weiser et Pillai, 1981, Bissett, 1983). Les phialides (cellules conidiogènes), isolées ou groupées en verticille, ont une forme elliptique à subglobuleuse au niveau de la partie inférieure, et cylindrique à l'extrémité supérieure. On retrouve les phialides à l'extrémité et/ou en position latérale sur les conidiophores.

Chez T. cylindrosporum, le cycle d'infection commence par la fixation des conidies sur la cuticule. Ensuite, il y a formation d'un tube germinal qui traverse la cuticule et produit les hyphes, qui en se ramifiant, envahiront l'hémocoel et les tissus de la larve. Dans l'hémocoel, il peut y avoir production de blastospores (Goettel, 1988a). Les blastosconidies ($9-25 \times 3,5-5 \mu\text{m}$) sont elliptiques à cylindriques et elles bourgeonnent sur les hyphes, à l'extrémité de courtes ramifications (Samson et Soares, 1984). Après la mort de la larve, les hyphes émergent de la cuticule et croissent dans le milieu environnant, en se ramifiant. Sur les cadavres flottant à la surface de l'eau, les hyphes forment un amas de mycélium qui, en contact avec l'air, produit des

conidiophores et des conidies comme sur un milieu de culture synthétique solide (Soares, 1982, Samson et Soares, 1984, Ravallec et al, 1989).

I. 1.2 MAINTENANCE DES SOUCHES ET PRODUCTION DES STRUCTURES INFECTIEUSES.

Une des deux souches de C. clavisporus provient de l'A.T.C.C. (American Type Culture Collection, no. 38 490) et fut isolée d'An quadrimaculatus; l'autre, provient de l'U.A.M.H. (University of Alberta Microfungus Collection, no. 4 854). Cette dernière fut isolée de Cs inornata en Alberta (Canada) par M. Goettel (1987b). La croissance végétative se réalise sur de l'agar enrichi d'extrait de levure, de phosphate dipotassique, d'amidon et de sulfate de magnésium (gélose YpSs) (annexe A). On incube les mycètes à la température ambiante (20⁰ C).

On maintient les souches en transférant à tous les mois un morceau de la culture (environ un cm²) sur un autre milieu stérile. Le morceau de mycélium est toujours prélevé en bordure de la croissance, où se trouve les jeunes cellules mycéliennes en plein développement. Ce prélèvement s'effectue de façon aseptique, à l'aide d'un scalpel stérile. Cette technique permet de conserver le mycète in vitro, en lui fournissant régulièrement les éléments nutritifs nécessaires à sa croissance.

Culicinomyces clavisporus sporule tant en milieu solide que liquide. Pour la production des conidies, on utilise le milieu liquide. Avec un scalpel

stérile, on dépose des morceaux de gélose contenant le mycélium, dans des erlenmeyers d'une capacité de 250 ml, contenant 100 ml d'extrait de farine de maïs (bouillon FM) (annexe A). On incube les bouillons à 20° C sur l'agitateur rotatif (Model G-2, New-Brunswick) à 25 rpm.

Après deux semaines d'incubation, on filtre les bouillons sur un tamis de 45 µm, pour enlever les hyphes et ne récolter que les conidies dans le filtrat. Pour séparer les conidies du milieu de culture, on centrifuge le filtrat à 2 000 rpm pendant 20 minutes (Model Centra-7R, IEC, Damon, U.S.A.). Pour laver les conidies, on décante le surnageant, on resuspend le culot dans de l'eau distillée stérile et on centrifuge à nouveau. Cette opération est répétée deux fois. Après la deuxième centrifugation, on resuspend le culot dans de l'eau distillée stérile et on mesure la concentration en conidies de la suspension avec l'hématimètre (Petroff-Hausser). On conserve la suspension à -70° C.

La souche numéro 4 561 de l'U.A.M.H. de T. cylindrosporum est utilisée pour nos expériences. Elle fut isolée d'Ae sierrensis en Californie (Etats-Unis). On cultive T. cylindrosporum à 20° C sur de l'agar contenant de la céréale d'avoine (gélose "Pabium") (annexe A). On effectue des repiquages aux deux semaines pour maintenir la souche.

Contrairement à C. clavissporus, la croissance en milieu liquide n'entraîne pas la formation de conidies. Dans les bouillons, T. cylindrosporum

produit des blastoconidies. Les conidies et les blastoconidies sont infectieuses pour les moustiques.

Pour obtenir une bonne production de conidies, on repique le mycète dans des vases de Pétri de 15 cm de diamètre. Après deux ou trois semaines, le mycète couvre la surface du vase de Pétri. A ce moment, on récolte les conidies en projetant un jet d'eau distillée stérile sur le mycélium. Lors de cette manipulation, le vase de Pétri est incliné au dessus d'un contenant qui reçoit les conidies détachées du mycète et entraînées par l'eau. On calcule la concentration en conidies avec l'hématimètre et on entrepose la suspension obtenue à -70°C .

On produit les blastoconidies dans des bouillons Sabouraud-Dextrose (Difco, 0382-17-9). On ajoute des morceaux de mycélium provenant d'une gélose Pablum (deux morceaux d'environ 1 cm^2) dans un erlenmeyer de 1 000 ml contenant 500 ml de bouillon. On peut également inoculer les bouillons à partir d'une suspension de conidies. Pour ce faire, on verse 10 ml d'eau distillée stérile dans un vase de Pétri contenant le mycélium croissant sur le milieu gélosé; on agite le mycélium avec un fil bouclée stérile, pour décrocher les conidies des conidiophores. Puis on prélève 1 ml de la suspension de conidies, que l'on inocule dans un bouillon Sabouraud-Dextrose. Les bouillons sont incubés à 20°C et subissent une agitation constante de 25 rpm. Après cinq jours, on filtre les bouillons sur un tamis de $160\text{ }\mu\text{m}$, pour récupérer les blastoconidies dans le filtrat. Pour enlever le milieu de culture, on centrifuge à 2 000 rpm pendant 30 min. Pour le lavage des blastoconidies,

on effectue les mêmes manipulations que pour C. clavisporus. On mesure la concentration en blastoconidies avec l'hématimètre et on conserve la suspension dans de l'eau distillée stérile à -70°C .

I. 1.3 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR MOUSTIQUES.

On peut définir un essai biologique, comme étant une méthode qui permet d'évaluer la réponse d'un organisme vivant à un stimulus. Dans le cas des larvicides, on évalue la réponse (mort ou vivant) des larves à la présence d'une concentration ou d'une dose d'un mycète (stimulus). Il y a trois groupes de facteurs qui peuvent faire varier la réponse, ceux dépendant du stimulus (état physiologique du mycète, concentration, temps de contact,...), de l'organisme cible (santé, âge, comportement alimentaire, compétition,...) et ceux dépendant de l'environnement (température, turbidité,...). Lors d'essais biologiques, on peut faire varier chaque facteur et mesurer son effet sur l'activité du larvicide.

I. 1.3.1 ESPECE CIBLE.

Les essais biologiques sont réalisés avec des larves d'Aedes triseriatus Say. Cette espèce de moustique s'étend des Etats-Unis jusqu'au sud du Canada et colonise principalement les creux d'arbres, divers contenants et même les pneus dans les dépotoirs sont des habitats facultatifs pour les larves (Andreadis, 1988, Nasci, 1988). L'espèce fut reconnue comme vecteur du virus LaCrosse, causant des encéphalites qui affligent principalement les enfants en

bas âge (Watts et al. 1975, Pantuwatana et al. 1973). Les larves d'Ae triseriatus s'alimentent de deux façons: par filtration de la matière en suspension et/ou par broutage (Fish et Carpenter, 1982). Les oeufs de cette espèce multivoltine lui permettent de survivre pendant l'hiver ou les périodes de sécheresse. On élève l'espèce en laboratoire, selon la méthode proposée par Munstermann et Wasmuth (1985).

I. 1.3.2 DÉVELOPPEMENT LARVAIRE D'AEDES TRISERIATUS.

Aedes triseriatus possède quatre stades larvaires. Lors des essais biologiques, pour éviter que le stade larvaire n'entraîne une trop grande variation dans les résultats et ainsi rendre l'interprétation des données difficiles, tous les individus utilisés seront au même stade larvaire. A l'élevage, il existe des variations entre les individus lors de leur développement. Certains immatures franchiront les différents stades larvaires et émergeront plus rapidement que d'autres. Nous avons donc développé un protocole expérimental simple pour déterminer , dans des conditions environnementales contrôlées et reproductibles, la période pendant laquelle la majorité des larves sont au 1^{er}, 2^{ième}, 3^{ième} et 4^{ième} stade, ce qui permet d'obtenir un nombre optimal et suffisant de larves à un stade donné, pour la réalisation des essais biologiques.

Les oeufs sont conservés sur des rubans de papier (40 x 5 cm). Pour réaliser l'éclosion, on utilise des pontes d'au moins deux semaines. A ce moment, on prend le ruban et on le coupe en quatre parties égales. On dépose

les bouts de ruban dans quatre vases de Pétri. Ensuite, on ajoute 25 ml d'eau distillée et on saupoudre la surface avec 0,10 g de levure de bière desséchée (Bioforce Canada, Montréal). Environ 30 minutes plus tard, les premiers oeufs vont éclore.

Après sept heures d'éclosion, on enlève les bandes de papier contenant les oeufs qui n'ont pas éclos et on vide chaque vase de Pétri contenant les jeunes larves, dans des bassins en plastique (46 x 32 x 6 cm) contenant chacun deux litres d'eau distillée. On alimente les larves au trois jours avec 5 ml d'une solution de poudre de foie desséchée (18g/300ml d'eau distillée)(Swiss, 1805022). L'élevage s'effectue à 22° C avec une photophase de 18:6 LO (lumière, obscurité). Le niveau d'eau est maintenu à deux litres par l'ajout quotidien d'eau distillée. L'expérience se termine lorsque les pupes apparaissent dans les bassins. A chaque jour, on prélève au hasard, 25 larves par bassin et on identifie le stade larvaire. On calcule le pourcentage moyen des individus appartenant au 1^{er}, 2^{ième}, 3^{ième} et 4^{ième} stade larvaire.

Une larve de 1^{er} stade larvaire est facilement reconnaissable par la présence du tubercule céphalique sur le vertex de la capsule (Dodge, 1966). Le 2^{ième} présente une plaque sclérotisée supportant les soies de chaque côté du métathorax, alors qu'au 3^{ième} on en compte deux (Savignac et Maire, 1981). Au 4^{ième} stade, soit qu'il y a sclérotisation du segment anal, sinon la soie 1-X sera située sur la selle, plus près de la marge postérieure que de la marge ventrale (Smith, 1969, Wood, 1984).

Si on regarde la tableau 2, on observe que la période pour obtenir un nombre optimal de larves de 1^{er} stade, se situe entre l'éclosion et la troisième journée; pour le 2^{ième} stade, aux jours quatre et cinq; le 3^{ième} entre huit et neuf jours post-éclosion, et le 4^{ième} à partir de la 17^{ième} journée. Donc en plus d'obtenir un pourcentage optimal, on peut également mieux planifier les essais biologiques.

I. 1.3.3 VIABILITÉ DES STRUCTURES INFECTIEUSES.

Lors des essais biologiques, on expose des larves à différentes concentrations d'une suspension de conidies viables, c'est à dire celles qui possèdent la capacité d'infecter leur hôte. Une conidie ou une blastoconidie qui germe (forme un tube germinal) sur un milieu synthétique, est considérée comme étant viable.

Donc à chaque essai biologique, on détermine à partir d'une concentration de conidies en provenance de la suspension mère, la proportion de conidies viables à laquelle les larves sont exposées, en multipliant la concentration de conidies par la proportion qui germent sur le milieu gélosé Pomme de terre-Dextrose (gélose PD) (BBL, 11550) entre 24-48 heures.

On étend sur la gélose avec une pipette Pasteur stérile, quelques gouttes d'une suspension conidienne (10^4 - 10^5 conidies/ml) et on incube à 20⁰ C. Après 24-48 heures, on place la gélose sous l'objectif de 40x et on dénombre dans cinq aires d'observation, les conidies qui germent et celles qui ne

Tableau 2

Développement larvaire d'Aedes triseriatus.
 Pourcentage moyen des différents stades en fonction du temps.

Temps jours	Stades larvaires			
	1	2	3	4
1	100%			
2	100			
3	99	1%		
4	2	98		
5	1	99		
6		53	47%	
7		25	75	
8		9	91	
9			97	3%
10			69	31
11			38	62
12			40	60
13			42	58
14			7	93
15			24	76
16			4	96
17			2	98
18				100
19				100

germent pas. Par exemple, si à partir d'une suspension mère de 10^5 conidies/ml, on obtient 80% de germination, on dira que les larves seront exposées à une concentration de 8×10^4 conidies viables/ml. Ou bien, on ajoutera 20% de plus de la suspension mère pour maintenir 10^5 conidies viables/ml.

Avant de germer, les conidies de T. cylindrosporum vont se gonfler au deux extrémités et prendre une forme d'haltère ou d'arachide (Goettel, 1988). Plus tard, le tube germinale émerge soit à l'une ou au deux extrémités de la conidie pour former les hyphes qui se ramifieront. Lors des calculs de proportion, on considérera comme conidie viable, une conidie de T. cylindrosporum qui aura cette forme d'haltère ou d'arachide. Il n'y a pas de changement perceptible dans la structure des blastoconidies avant la germination. Les blastoconidies germent en formant un tube germinale à l'une ou aux deux extrémités de la blastoconidie et ensuite les hyphes croissent.

Les conidies de C. clavisporus germent en formant un tube germinale à l'une ou aux deux l'extrémités de la conidie.

I. 1.3.4 ESSAIS BIOLOGIQUES.

Des essais préliminaires détermineront les souches mycéliennes qui tuent de façon significative, les larves d'Ae triseriatus. De plus, ces essais nous donneront une estimation des concentrations létales et du temps d'incubation de la mycose.

Les tests se réalisent avec des larves de 2^{ème} stade maintenues à 20° C avec une photophase de 18:6 L:D. On expose les larves à quatre suspensions de conidies, des différentes souches (concentrations finales: 10⁷, 10⁶, 10⁵, et 10⁴ conidies/ml). Un témoin contient une suspension (10⁶/ml) de conidies détruites par autoclavage, un autre témoin ne contient que les larves dans l'eau distillée.

Les essais se font dans des contenants de plastique d'une capacité de 120 ml. Dans chaque contenant, on verse environ 50 ml d'eau distillée et on y place 25 larves de moustiques. On ajoute la suspension de conidies, et on complète le niveau à 100ml avec de l'eau distillée. Le niveau d'eau est maintenu à 100 ml, par l'ajout quotidien d'eau distillée. On alimente les larves au deux jours en ajoutant aux contenants, 0,2 ml de la solution de poudre de foie desséchée. Les essais biologiques se terminent lorsque tous les individus sont morts, ou ont émergé. Lorsque les pupes apparaissent dans les contenants, on place des filets au-dessus de ces derniers pour éviter toute dispersion des adultes.

A chaque jour, on dénombre le nombre d'individus morts et vivants de chaque contenant. Avec l'extrémité arrondie d'une pipette Pasteur, on touche légèrement le corps de la larve. Une larve vivante, s'agite et fuit la pipette en zigzaguant. Une larve morte se laisse entraîner par le mouvement d'eau créé lors du stimulus. On prélève les morts pour éviter qu'il y ait sporulation du mycète sur le cadavre, ce qui changerait la concentration de

conidies dans le milieu. Les cadavres sont conservés dans l'alcool 70% pour l'identification ultérieure du stade larvaire.

1. 1.3.5 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

Pour que le mycète ait un potentiel larvicide au Canada, il devra entre autre conserver son pouvoir infectieux dans des eaux de climat tempéré.

Pour vérifier ceci, on effectue des essais biologiques où l'on fait varier la température. Les essais sont effectués en triplicata à 18, 20 et 25° C, avec des larves de 2^{ième} stade d'*Ae triseriatus*, et une fourchette de quatre concentrations d'une suspension mère de conidies. Les essais se réalisent de la même façon que dans la partie 1.3.4.

1. 1.3.6 INFLUENCE DU STADE LARVAIRE.

Lors des sections précédantes, on exécutait les essais biologiques avec des larves de 2^{ième} stade. Certaines questions peuvent nous venir à l'esprit: est-ce que le stade larvaire a une influence sur les résultats? est-ce que les larves de 1^{er} stade sont plus sensibles à la mycose, que celles de 4^{ième} stade?

Pour évaluer l'influence du stade larvaire, on effectue une autre série d'essais biologiques, où cette fois, on soumet à diverses concentrations du

larvicide, des individus de 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} stade. On réalise les essais en triplicata à 20⁰ C, avec une fourchette de quatre concentrations et deux témoins.

I. 1.3.7 EVALUATION DES BLASTOCONIDIES.

Cette section a pour but de comparer le pouvoir larvicide des blastoconidies de T. cylindrosporum, par rapport à celui des conidies. On effectue un essai biologique en triplicata avec des larves de 2^{ème} stade d'Ae triseriatus. L'essai se réalise de façon identique à celui avec les conidies de T. cylindrosporum à 20⁰ C (partie I.3.5.).

I. 1.3.8 TEMPS DE CONTACT.

En laboratoire, les essais biologiques se déroulent généralement en contact continu pendant 24-48 heures ou jusqu'à l'émergence des adultes. Cependant, sur le terrain la réalité est tout autre.

Les larves de moustiques se développent en eaux stagnantes et parfois semi-stagnantes. Les larvicides de type particulaire, comme c'est le cas des conidies ou des blastoconidies, ne seront effectivement pas en contact continu avec les larves. Ces particules vont soit s'éloigner des larves ou sédimenter après un certains temps. Donc, il y aura un contact limité dans le temps.

L'importance du temps de contact est plus évidente avec les larves de simuliés. Ces dernières croissent dans des eaux courantes, parfois même très rapides. Lorsque l'insecticide est mélangé à l'eau courante, il se forme un "nuage" de particules qui se déplacera le long du cours d'eau, et qui passera sur les larves accrochées à leur substrat. Pratiquement, ce passage peut durer de quelques minutes à plusieurs heures.

Le but des expériences suivantes, est de vérifier le pouvoir larvicide de T. cylindrosporum sur les larves de moustiques, mais en utilisant des temps de contact simulant un peu plus la réalité du terrain.

Pour ces essais biologiques effectués en triplicata, à 20° C et avec une photophase 18:6 LO, on utilise deux suspensions de blastoconidies de T. cylindrosporum (concentration finale: 10^7 et 10^6 blastoconidies/ml). On utilise les blastoconidies, car on a obtenu des mortalités supérieures avec ce type de spores comparativement aux conidies. On place des larves de 2^{ième} stade d'Ae triseriatus avec les suspensions de blastoconidies pendant des temps de 30, 60, 120 et 360 minutes. Une fois le temps écoulé, on vide chaque contenant, en retenant les larves dans un filet. On lave les larves avec un léger jet d'eau et on les place dans un autre contenant avec 100 ml d'eau distillée et 0,2 ml d'une solution de poudre de foie desséchée. Dans un témoin, les larves sont en contact continu avec les blastoconidies, dans l'autre il n'y a que les larves dans l'eau distillée.

De plus, une autre série de contenants supplémentaires est réalisée pour les différents temps de contact. Après la période de contact, on sacrifie les larves de cette série en les plaçant dans le formol 70%, pour vérifier ultérieurement la présence des blastoconidies sur la cuticule et dans le tube digestif, par microscopie.

I. 1.3.9 FILTRATS DES BOUILLONS DE CULTURE.

Lors de leur croissance dans des milieux de culture synthétiques, certains mycètes entomopathogènes produisent des métabolites toxiques pour les insectes. La rapidité avec laquelle certains mycètes vont tuer leur hôte est souvent associée à cette production de toxines. Le but de cette section est d'évaluer le pouvoir pathogène des filtrats de bouillons de croissance de T. cylindrosporum.

Pour la croissance de T. cylindrosporum, on utilise un bouillon Sabouraud-Dextrose. Après deux à trois semaines de croissance, on filtre et on centrifuge les milieux tel qu'indiqué à la section 1.2, mais on récupère le surnageant, que l'on filtre sur une membrane de 0,45 µm. Pour les essais biologiques, on utilise des dilutions de 1/10, 1/20 et 1/100 du filtrat. Deux témoins contiendront respectivement des dilutions de 1/10 et 1/20 des bouillons nutritifs stériles, et un troisième aucun milieu de culture, ni surnageant. L'essai s'effectue en triplicata avec des larves de 2^{ème} stade d'Ae triseriatus maintenues à 20⁰ C avec une photophase de 18:6 LO.

I. 1.4 ESSAIS BIOLOGIQUES EN LABORATOIRE SUR SIMULIES.

Dans cette partie on évalue le pouvoir larvicide des conidies et des blastoconidies de T. cylindrosporum sur les larves de similies.

Ne possédant pas d'élevage de similies, nous devons récolter les larves sur le terrain, et les maintenir dans des bassins jusqu'à leur utilisation pour les essais biologiques. Ces essais diffèrent de ceux réalisés avec les larves de moustiques. Comme les larves de similies vivent dans les eaux oxygénées des rivières et ruisseaux, il faut leur fournir de l'eau courante lors des essais biologiques.

I. 1.4.1 ESPECE CIBLE.

Au Canada, les similies sont soit univoltines ou multivoltines. Même si les larves sont en abondance en saison estivale dans l'est du Canada, on peut s'en procurer durant toute l'année, car certaines espèces passent l'hiver à l'état larvaire, sous la glace, où elles se développent lentement. En eau courante, les larves se fixent à un substrat submergé (roche, végétation, branche,...) grâce à la soie sécrétée par leurs glandes salivaires et retenue par la couronne postérieure formée de nombreux crochets (Wood, 1985).

Les larves de similies utilisées pour les essais biologiques ont été récoltées à la décharge du lac Garant, à St-Elie de Caxton, dans la région de

Trois-Rivières. L'espèce fut identifiée à l'aide de la clé de Wood et al (1962): il s'agit de Simulium vittatum Zetterstedt.

On maintient les larves dans des bassins en "Plexiglass" composé d'une série de plaques et de valves (fig. 1). Les plaques à l'intérieur des bassins servent de substrats artificiels où les larves vont se fixer. Les valves reliées à un système d'air sous pression contrôlent l'entrée de l'air dans les bassins. Cet air pénètre dans le bassin par une série de petites perforations parallèles aux plaques, pour ainsi créer le courant d'eau nécessaire à la bonne vitalité des larves.

L'eau du bassin provient du ruisseau où les larves ont été recueillies. Chaque semaine, on remplace un tiers d'eau du bassin par de l'eau fraîche. Le bassin est placé dans une chambre environnementale à 4⁰ C. Cette température correspond à celle de l'eau d'où provient les larves. On attend de quatre à cinq jours avant d'effectuer tout essai biologique, pour permettre aux larves de s'adapter à leur nouvel environnement.

I. 1.4.2 ESSAIS BIOLOGIQUES.

Comme lors des premiers essais biologiques avec les moustiques, des essais sont effectués pour vérifier si T. cylindrosporum tue les larves de simules. Lors de ces essais, les larves sont en contact continu avec les conidies du mycète. Ces essais nous donnent également une indication des concentrations et des temps létaux.

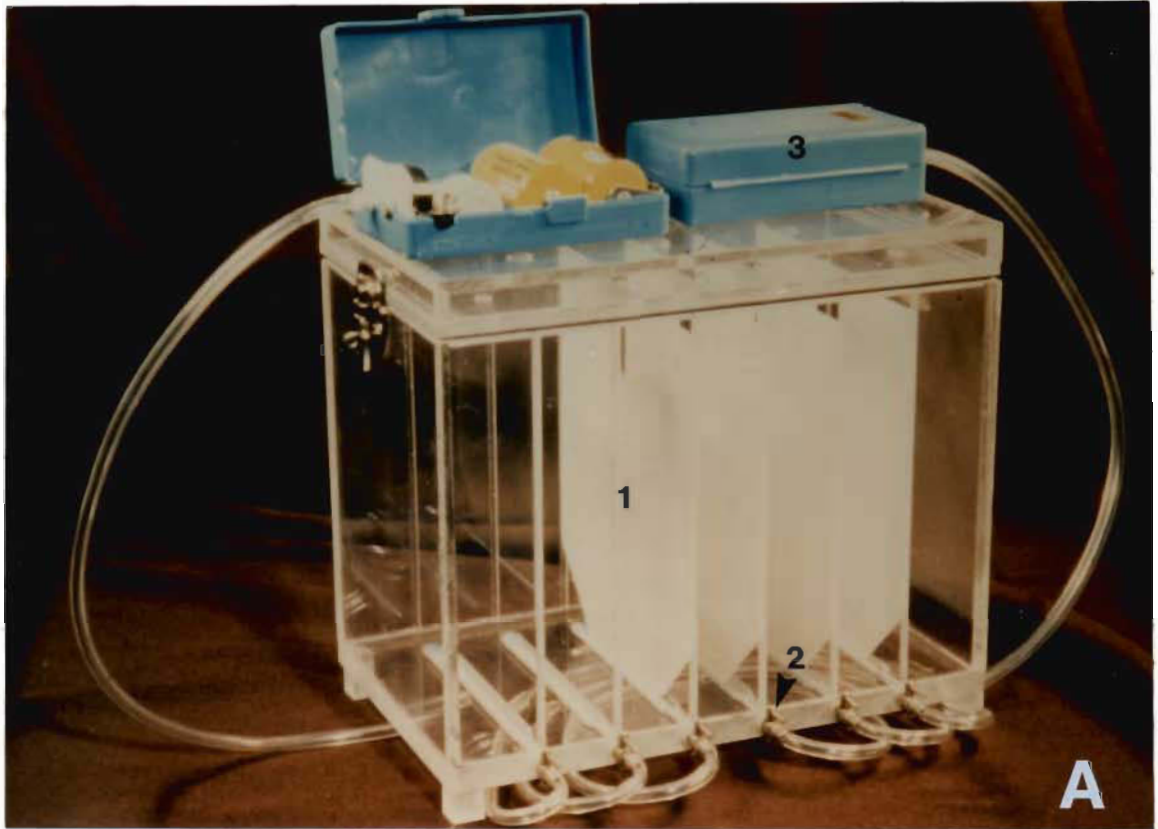
Figure 1. Système de maintenance des larves de simuliés.

A. 1 : Plaque de plastique

2 ►: Valve d'aération

3 : Pompe à air

B. Les larves fixées sur les plaques de plastiques sont aléatoirement transférées dans les contenants à essai biologique.



Les essais se réalisent dans des béciers de 600 ml contenant 300 ml d'eau distillée et entre 40-50 larves de simuliés. Dans les béciers, on retrouve un capillaire avec plusieurs perforations qui permettent l'entrée d'air dans le système, pour ainsi créer un courant d'eau (fig. 2).

Pour ces essais, on utilise des suspensions de concentration finale de 10^6 et 10^4 conidies/ml. Un témoin contient une suspension autoclavée de 10^6 conidies/ml et un autre, que des larves dans de l'eau distillée. La température est de 10^0 C. Quotidiennement, on compte les individus morts et vivants; on retire les morts pour éviter la rémanence, et on les conserve dans le formol 70%, puis on ramène le niveau d'eau à 300 ml.

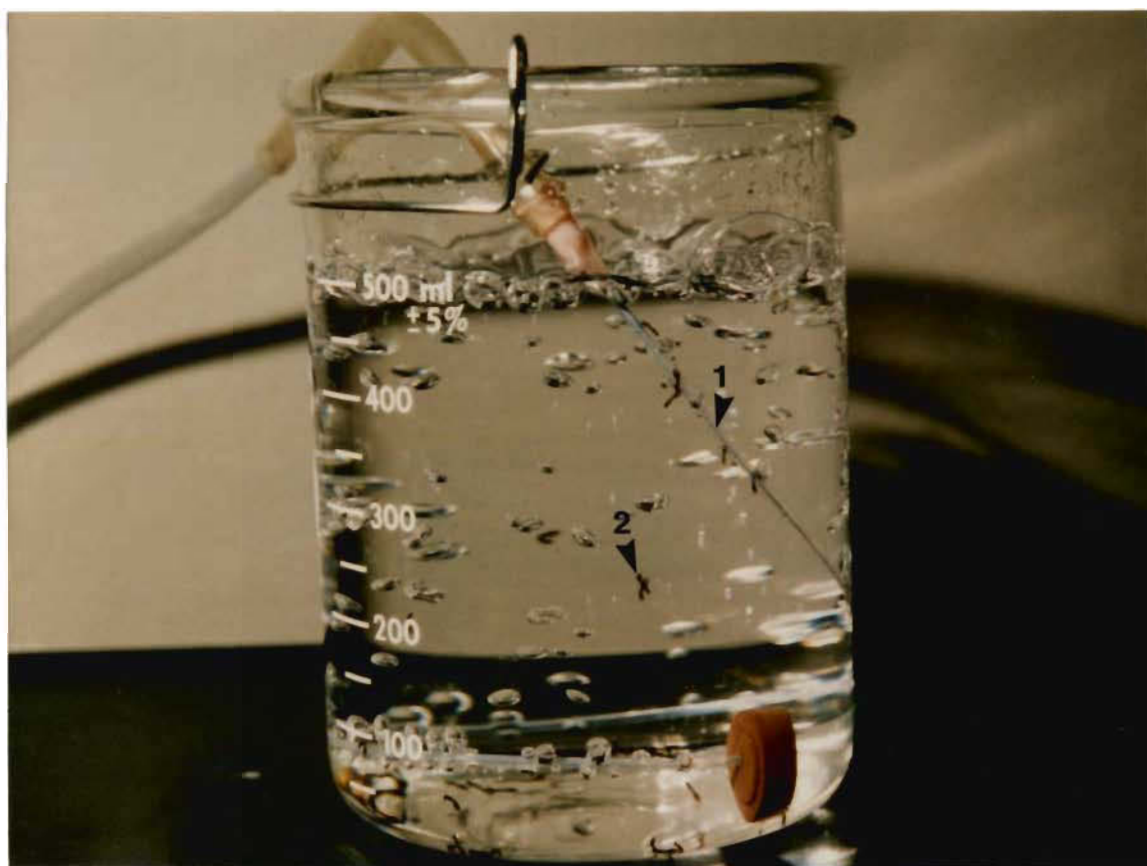
Pour déterminer si une larve est morte ou vivante, on la touche avec le bout arrondi d'une pipette Pasteur. Une larve vivante réagira au stimulus en secouant la partie antérieure de son corps, elle va lutter contre le courant créé par la pipette et se replacer en position initiale. Elle peut également se recroqueviller: la partie antérieure du corps rejoignant la partie postérieure, et ensuite reprendre sa position initiale. Une larve morte va se décrocher et se laisser entraîner par le courant, ou ne présentera aucune réaction au stimulus.

Si les conidies tuent de façon importante les larves de simuliés, on effectuera une autre série d'essais biologiques, en triplicata avec une fourchette de quatre concentrations de conidies et de blastoconidies, pour évaluer le pouvoir larvicide des spores et pour avoir une bonne estimation des concentrations létales. Pour des raisons hors de notre contrôle, nous n'avons pu

Figure 2. B cher pour les essais biologiques en laboratoire.

1 ► : Capillaire diffuseur d'air

2 ► : Larves de simuliés



réaliser une série d'expériences pour étudier en laboratoire l'effet du temps de contact de T. cylindrosporum sur les larves de simulies. Cet élément fut étudié directement sur le terrain, puisque nous avons trouvé un bon pouvoir larvicide des blastoconidies de T. cylindrosporum sur les larves de simulies, même si ce fut en contact continu.

I. 1.5 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR LE TERRAIN SUR SIMULIES.

Suite aux résultats prometteurs obtenus en laboratoire, nous avons vérifié l'effet de T. cylindrosporum sur des larves de simulies, mais cette fois en condition de terrain. Un système expérimental composé de gouttières colonisées par des larves de simulies et alimentées avec de l'eau de ruisseau est utilisée pour étudier l'effet larvicide des blastoconidies.

Dans les gouttières, les larves sont exposées à une concentration de blastoconidies qui passe durant un certains temps. En fait, les larves contrairement aux essais en béciers, sont exposées à une dose et non une concentration. Cette dose se définit comme étant le produit de la concentration (blastoconidies/L) par le temps de contact (sec) ou blastoconidies.L⁻¹.sec.

I. 1.5.1 LE SYSTEME EXPERIMENTAL.

Le système de gouttières est installé à proximité du ruisseau Boitel (Réserve faunique du St-Maurice) (fig. 3). Le fond des gouttières sert de substrat artificiel aux larves de simulies. Après avoir réduit le courant d'eau, on

Figure 3. Système de gouttières, pour les essais biologiques sur le terrain envers les simuliés.

A. 1 ► : Bouteille de Mariotte

2 ► : Filets de dérive

B. Simuliés fixées au fond des gouttières.



place dans les gouttières différents substrats naturels sur lesquels des larves de simules sont fixées. Les larves vont quitter ces substrats et se fixer au fond de la gouttière pour ainsi se retrouver dans le courant d'eau. Une fois que l'on a une quantité satisfaisante de larves (200-300) réparties sur la longueur de la gouttière, on enlève les substrats et on rétabli le courant original. Trois gouttières sont colonisées, deux reçoivent des doses différentes de blastoconidies et la troisième sert de témoin. On mesure le débit de chaque gouttière, pour déterminer la quantité totale de blastoconidies à introduire.

Les doses choisies sont 5×10^{10} et 5×10^9 blastoconidies. $L^{-1} \cdot sec$. Pour connaître la quantité de blastoconidies (y), on multiplie le débit par la dose;

$$\begin{array}{lcl} xL/sec & \times & 5 \times 10^{10} \text{ spores} \cdot L^{-1} \cdot sec = y \text{ spores} \\ \text{(débit)} & \times & \text{(dose)} \end{array}$$

Sachant que la solution mère contient $1,43 \times 10^{10}$ spores dans un volume de 100 ml ($1,43 \times 10^8$ /ml), par une simple règle de trois, on calcule le nombre de ml (z) de la solution mère que l'on doit utiliser;

$$\begin{array}{lcl} 1,43 \times 10^{10} \text{ spores} & \text{———} & 100 \text{ ml} \\ y \text{ spores} & \text{———} & z \text{ ml} \end{array}$$

La suspension de blastoconidies est ajoutée dans des bouteilles de Mariotte qui se vident en 10 min. Le temps de contact est établi à 30 min.

Donc, on utilise trois bouteilles par gouttière. Chaque bouteille recevra alors le tiers de la valeur z calculée.

Avant d'introduire les doses de larvicide, on laisse les larves s'acclimater au système pendant quelques heures. Ensuite, on installe des filets de dérive à l'extrémité des gouttières et on introduit l'insecticide. Après la vidange des trois bouteilles, on prélève 25 larves dans chaque gouttière et on les sacrifie en les plaçant dans une solution de Bouin . Ultérieurement, on les examinera au laboratoire pour vérifier la présence de spores dans l'intestin des larves.

Chez les simuliés, la transition de la larve à l'adulte se réalise dans la pupa. Les pupes restent sous l'eau partiellement enfermées dans des cocons, ensuite il y a émergence ou sortie de l'adulte. Quotidiennement, on note la température (min., max.), le nombre de larves mortes et vivantes et le nombre de cocons pleins et vides dans les gouttières et les filets de dérive. Un cocon vide indique que l'adulte a émergé. Les larves mortes sont placées dans une solution de Bouin.

I. 2 ISOLATION ET EVALUATION DE LA VIRULENCE DE MYCETES PROVENANT D'OEUFES, DE LARVES ET D'ADULTES DE SIMULIES.

Molloy (1987) fait mention des genres et de la classe de mycètes suivant, parasitant les simuliés: Coelomycedium, Entomophthora, Phycomycète et Simuliomyces. On y fait mention également, des caractéristiques des

mycoses; par exemple, les Entomophthorales sont un groupe de mycètes qui se caractérisent par l'éjection de leurs conidies. Lors de l'isolation, différentes techniques peuvent servir à mettre en évidence les mycètes. La connaissance des caractéristiques des mycoses sur l'insecte, sont utiles dans le choix de la technique d'isolement.

Roberts et Humber (1981) décrivent les différents types de relation existant entre les mycètes et leur insecte hôte. On y retrouve de la pathogénécité facultative, du parasitisme, du saprophytisme, du commensalisme, de la symbiose et bien sûr de la pathogénicité. Ces auteurs définissent les mycètes pathogènes comme "causant une mort rapide de l'hôte en pénétrant et en proliférant dans l'hôte, lequel meurt par l'invasion ou digestion des tissus, et/ou par libération de toxines".

Une fois le mycète isolé et maintenu in vitro, on cherche à déterminer s'il est pathogène pour les larves de l'insecte hôte. Si tel est le cas, le mycète peut s'avérer intéressant pour le contrôle biologique.

1. 2.1 DECOUVERTE DES MYCOSES.

Les prospections ont été effectuées à la Réserve faunique du St-Maurice, située à 120 km au nord de Trois-Rivières. Cette réserve se trouve dans la région écologique de la sapinière à bouleau blanc, du Québec méridional. C'est une forêt de transition, comprenant bétulaie blanche et sapinière à épinette rouge ou noire. On y trouve de nombreuses mares et cours

d'eau, qui sont des gîtes favorables aux populations de moustiques et de simulies. Lors des prospections, on visitait les différents sites larvaires des simulies: ruisseaux, décharges de lac, suintements, à la recherche de larves ou d'adultes de simulies moribondes ou atteintes de mycoses. Effectivement, ces prospections ont donné des résultats intéressants.

A l'automne 1987, cinq larves moribondes de S. vittatum ont été prélevées au ruisseau Castor Noir, à la décharge du lac Inman Est. Les larves étaient fixées à la végétation du ruisseau. Le courant était faible et la température de l'eau de 6° C. Les immatures étaient de couleur verdâtre, avaient l'abdomen distendu et il n'y avait pas de présence mycélienne sur la cuticule. Les spécimens ont été rapportés au laboratoire et placés dans l'eau de ruisseau, à 6° C. Quelques jours plus tard les larves étaient mortes, et de 12 à 24 heures plus tard, on observait une forte croissance de filaments mycéliens sur la cuticule.

Au printemps 88, des simulies adultes (Simulium venustum/verecundum) sont trouvées mortes, fixées à un bout de bois en bordure du ruisseau Castor Noir. Les individus étaient très jeunes et la mycose momifiait la plupart d'entre eux.

A l'été 1988, des oeufs de simulies ont été récoltés à la décharge du lac Garant, à St-Elie de Caxton, dans la région de Trois-Rivières. Ces oeufs étaient conservés à 4° C. Les oeufs récoltés pour réaliser des cultures cellulaires, avaient été stérilisés dans l'hypochlorite de sodium (3%) et placés

dans un milieu de culture (Mitsubishi & Maramorosch, Gibco, 82-5010EC), additionné de 100 ui/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Après quelques jours d'incubation à 20⁰ C, des hyphes mycéliens faisaient leur apparition à la surface des oeufs.

Au mois de juin 1989, des jeunes simulies adultes étaient trouvées mortes au ruisseau Castor Noir. Ces simulies étaient retrouvées au même endroit que celles du printemps 88, et de plus semblaient présenter la même mycose caractéristique du groupe des Entomophthorales.

Jusqu'à la mi-août, trois autres sorties ont été effectuées pour suivre l'évolution de cette épizootie au Castor Noir, et pour vérifier l'étendue de la mycose, en visitant différents sites à simulies.

1. 2.2 ISOLATION DES SOUCHES

Pour les larves moribondes de simulies, on isole les souches mycéliennes en prenant aseptiquement des fragments d'hyphes qui croissent sur la cuticule, et en les déposant sur des milieux de culture gélosés, ou bien en plaçant la larve directement sur le milieu de culture. Pour cette isolation, nous utilisons les milieux suivants: PD, Sabouraud- Dextrose /Jaune d'oeuf et lait coagulé (annexe A), Sabouraud-Dextrose (BBL 11584) et FM. Les cultures sont incubées à 20⁰ C, à l'obscurité, et on les observe régulièrement pour vérifier la croissance mycélienne.

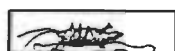
Sur certaines géloses, on aura plus d'un type de mycètes. Pour les séparer, on prélève un morceau de la culture avec un scalpel stérile, et on le place sur un milieu frais. Parmi les milieux de culture mentionnés ci-haut, on retient pour la maintenance, celui où la croissance est maximale après quelques jours d'incubation.

Souvent les mycètes isolés sont contaminés par des bactéries. Pour purifier les cultures, on transfère un morceau de gélose sur un milieu frais contenant de la gentamycine (100 mg/L) et du chloramphénicol (50 mg/L). Après quelques repiquages, on obtient des souches exemptes de bactéries. A ce moment, on repique les souches sur des milieux sans antibiotiques. On place les cultures de mycètes à 4⁰ C. Au deux mois, on les repique sur des milieux frais, on les laisse croître pendant quelques jours à 20⁰ C, puis on les replace à 4⁰ C pour deux autre mois. En ce qui concerne les oeufs, ceux présentant une croissance mycélienne ont été déposés individuellement sur les milieux gélosés.

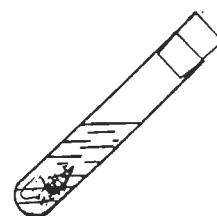
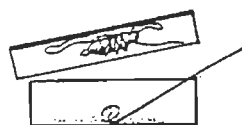
Papierok (1986) propose une méthode pour l'isolement et l'étude des Entomophthorales, à partir d'insectes atteints d'entomophthoroses (fig. 4). Cette technique est basée sur le comportement des Entomophthorales qui durant la sporulation vont éjecter leurs spores végétatives (conidies). Cette technique fut utilisée pour les adultes de simulies récoltées en 1989. Pendant cette période, à chaque site où l'on trouvait des simulies présentant des signes d'entomophthorose, on récoltait un échantillon. Lorsque possible, on emportait les individus avec le substrat sur lequel ils étaient fixés. Au laboratoire, après

Figure 4. Différentes phases de la préparation, aux fins d'étude d'un insecte mort d'entomophthorose. (tiré de B. Papierok, 1986).

Insecte mort d'entomophthorose → Mise en place de l'insecte sur cellulose mouillée → Récolte des conidies sur lame → Isolement (par raclage des conidies déposées sur le fond d'une boîte de Petri stérile) → Mise du cadavre dans alcool 65 %



couvercle de
boîte de Petri



Conservation
(à sec)



Collection
de
souches



Conservation

observation des individus, on choisissait certains spécimens, en général ceux dont le corps n'était pas encore complètement recouvert par le mycète, pour les faire sporuler.

Pour la sporulation, on place la simule dans une "chambre humide". Cette chambre est constituée d'un vase de Pétri stérile, dans lequel on a placé au fond une lame (stérile) de préparation microscopique, et à l'intérieur du couvercle un morceau de cellulose imbibée d'eau distillée stérile. Avec une pince, on dépose l'insecte sur la cellulose, le dos faisant face à la lame. On place la chambre à 20⁰ C, à l'obscurité. Il y aura imbibition du spécimen ce qui favorisera la formation des conidiophores et des conidies primaires (Papierok, 1986). Ces conidies seront projetées sur la lame. Les spécimens, recouverts de conidiophores sont conservés dans l'alcool 70%. Certaines lames sont conservées à sec, d'autres servent à la mise en culture du mycète. A cette fin, on utilise le milieu solide Sabouraud-Dextrose/jaune d'oeuf/lait coagulé, et le milieu de culture de tissus de Grace (Gibco, 350-1590 AJ) additionné de 5% de sérum foetal de veau (Gibco, 200-6140 AJ) (40 ml dans un erlenmeyer d'une capacité de 500 ml).

Pour ensemençer le milieu solide, on prend un petit morceau du milieu gélosé, on le frotte sur la lame où se trouvent les conidies et on retourne le morceau sur la gélose. Pour les bouillons, on dépose la lame directement dans l'erlenmeyer contenant le milieu de Grace. On incube les cultures à 20⁰ C, à l'obscurité. On effectue des repiquages sur des milieux frais

aux deux semaines. Les repiquages précédents sont conservés à 4⁰ C et on repique les souches au deux mois.

Aux fins d'identification, les Entomophthorales ont été envoyées au Dr. Bernard Papierok (Institut Pasteur, Paris, France), les autres souches ont été transmises au Dr. John Bissett (Centre de Recherche en Biosystématique, Ottawa, Canada) et au Dr. Alain Vey (Station de Recherche de Pathologie Comparée, INRA, St-Christol les Alès, France).

1. 2.3 EVALUATION DE LA VIRULENCE.

Pour savoir si les mycètes isolés à partir des oeufs, larves et adultes de simulies possèdent un pouvoir larvicide sur les diptères piqueurs, on réalise des essais biologiques avec des larves d'Ae. triseriatus. Une série d'essais vérifie la virulence des conidies, et une autre série, celle du filtrat de culture où croissent les mycètes, pour détecter la présence éventuelle de métabolites toxiques.

1. 2.3.1 CULTURE, ET DESCRIPTION DES SOUCHES ISOLEES.

Parmi les différentes souches isolées et purifiées, trois ont été sélectionnées: 44 (Fusarium moniliforme Sheldon), 6J (Acremonium sp.), B (Acremonium bactrocephalum Gams). La souche de F. moniliforme provient d'une larve de S. vittatum, l'Acremonium sp. d'un des adultes de S. venustum/verecundum et l'A. bactrocephalum d'un des oeufs de simulies. Les

trois souches croissent et sporulent tant en bouillon que sur gélose. On cultive 44 et B sur le milieu Pablum, et 6J sur le milieu PD. Ces cultures sont incubées à 20° C, à l'obscurité. Pour les bouillons, on utilise le milieu FM pour les trois souches. On inocule des morceaux d'une culture solide dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'extrait de farine de maïs et on incube à 20° C à 25 rpm.

Les souches 44, 6J et B, sont toutes des Deutéromycètes. Nous n'entreprendrons pas ici, une description détaillée des souches, mais on se limitera à une brève description des formes et des mesures des conidies, produites sur des milieux gélosés. Ce sont d'ailleurs ces conidies qui serviront à évaluer le pouvoir pathogène de ces souches, à la section II.3.3. *E. moniliforme* (44), donne sur le milieu gélosé des microconidies de forme ovale à cylindrique de 6,0-12,0 x 2,0-5,0 µm. L'*Acremonium* sp. (6J), sur le milieu gélosé produit également des conidies cylindriques aux extrémités arrondies de 3,0-5,0 x 1,0-2,0 µm. La troisième souche, *A. bactrocephalum* (B), produit des conidies ovales à cylindriques (extrémités arrondies) de 4,0-8,5 x 1,5-2,5 µm.

1. 2.3.2 PRODUCTION ET VIABILITÉ DES CONIDIES.

Pour la production des conidies, on utilise les milieux de culture solides. On récolte les conidies par projection d'un jet d'eau distillée stérile à la surface des vases de Pétri. Les concentrations des suspensions de conidies sont évaluées avec l'hématimètre et on entrepose les suspensions à -70° C. Pour

mesurer la viabilité des conidies lors des essais biologiques, on fait les mêmes manipulations et les mêmes calculs qu'à la section 1.3.3. Pour les trois souches (6J, 44 et B), on considère que si une conidie germe, elle est viable. La germination se manifeste pour l'ensemble de ces souches, par la formation d'un tube germinatif à l'une ou au deux extrémités des conidies.

1. 2.3.3 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR MOUSTIQUES.

Les essais biologiques sur moustiques ont pour but de vérifier le pouvoir pathogène des conidies et des filtrats de bouillons de culture des trois souches mycéliennes. Les essais biologiques s'effectuent en triplicata, avec des larves de 2^{ème} stade larvaire d'*Ae triseriatus* maintenues à 20° C, avec une photophase de 18:6 LO. En ce qui concerne les essais avec les conidies, on réalise une fourchette de quatre concentrations (concentrations finales: 10⁷, 10⁶, 10⁵ et 10⁴ conidies/ml). On effectue également deux témoins; l'un contient une suspension de conidies autoclavées (10⁶ conidies/ml) et l'autre des larves dans l'eau distillée.

Pour obtenir les filtrats de culture, on effectue les manipulations suivantes. Après environ deux à trois semaines d'incubation à 20° C sur l'agitateur à 25 rpm, on filtre les milieux (tamis de 45 µm) et on centrifuge le filtrat à 2 000 rpm pendant 20 min. Par la suite, on récupère le surnageant et on le filtre sur une membrane de 0,45 µm. Ce filtrat servira de solution mère lors des essais biologiques.

Les essais biologiques s'effectuent avec une fourchette de trois dilutions de la solution mère: 1/10, 1/20, et 1/100. Deux témoins contiennent une dilution de 1/10 et de 1/20 du milieu de culture FM, le troisième témoin ne contient que les larves et de l'eau distillée.

I. 2.3.4 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR LE TERRAIN SUR SIMULIES.

Cette partie consiste à évaluer le pouvoir pathogène des conidies de deux souches de mycètes (B et 6J) sur des larves de simules. La souche 44 n'a pas été retenue à cause d'une trop faible production de conidies. Cet essai se fait sur le terrain avec le système des gouttières, tel que décrit à la section 1.5. Les doses et le temps de contact sont identiques à l'essai fait avec T. cylindrosporum.

I. 2.3.4.1 PRODUCTION DE MASSE DES CONIDIES.

Pour les essais sur le terrain, on a besoin d'une bonne production de conidies. Goettel (1984) a développé une technique pour la production de masse de conidies d'Hyphomycètes. Nous avons modifié cette technique pour produire les conidies d'A. bactrocephalum (souche B).

On prépare 500 ml du milieu de culture Pablum contenant de l'agar (15%) (BBL 11849) et on l'étend dans un plateau métallique (50 x 32 x 6 cm). Ensuite, on scelle le plateau avec une pellicule plastique (Saran Wrap, Dow Chemical Co.). On passe le plateau à l'autoclave (20 min., 15 psi, 125° C) pour

stériliser le tout. Après solidification du milieu, on inocule la gélose, en injectant avec une seringue hypodermique stérile, 10 ml d'une suspension mère de conidies (10^7 conidies/ml) à travers la pellicule plastique. Ensuite, on referme le trou produit par l'aiguille, avec un morceau de ruban gommé stérile et on incline le plateau de gauche à droite pour répandre uniformément l'inoculum. L'incubation se fait à 20° C, à l'obscurité. Après une semaine, la gélose est recouverte de mycélium. On récupère les conidies en projetant 100 ml d'eau distillée stérile à la surface.

La production de masse des conidies pour la souche 6J s'effectue dans des bouillons d'extrait de boeuf, additionné de peptone (bouillon BEP, annexe A). On ensemence avec des morceaux du mycète provenant d'une culture solide (PD) dans des erlenmeyers de 1 000 ml contenant 500 ml de milieu BEP et on incube à 20° C. Après cinq jours, on filtre le bouillon (tamis de 45 μ m) et on centrifuge le filtrat à 2 000 rpm pendant 30 min. On décante et on lave le culot de conidies deux fois avec de l'eau distillée stérile, par centrifugation. On resuspend le culot dans l'eau distillée stérile et on calcule la concentration en conidies de la suspension avec l'hématimètre.

CHAPITRE II

RESULTATS

Dans ce chapitre, nous verrons les différents résultats de l'évaluation des deux souches de C. clavisporus, et de celle de T. cylindrosporum comme pathogène des larves de moustiques et de simules, ainsi que certains facteurs influençant la virulence de ces mycètes. Ensuite, nous présenterons les résultats obtenus à partir des isolats d'oeufs, de larves et d'adultes de simules.

II. 1 EVALUATION DES SOUCHES DE CULICINOMYCES CLAVISPORUS.

II. 1.1 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR AEDES TRISERIATUS.

Les figures 5 et 6 présentent les résultats obtenus avec les deux souches de C. clavisporus (ATCC et UAMH) lors des essais biologiques préliminaires sur des larves de moustiques. Tel que mentionné dans le chapitre matériel et méthode, des larves du 2^{ième} stade sont exposées à quatre suspensions de conidies, les témoins numéro 2 contiennent les suspensions de conidies autoclavées d'une concentration de 10^5 conidies/ml, et les essais se déroulent à 20⁰ C.

Pour la souche UAMH (fig. 5), on observe une forte mortalité aux concentrations les plus élevées (10^5 - 10^6 conidies/ml), atteignant 60% après trois jours d'exposition continue. Après sept jours, on obtient un plateau avec une mortalité cumulée de 95% aux concentrations de 10^5 - 10^6 conidies/ml, comparativement à 15% pour les témoins. En ce qui concerne la souche ATCC (fig. 6), on note également une bonne mortalité aux concentrations de 10^5 - 10^6 conidies/ml. Après sept-huit jours d'exposition, la mortalité se stabilise à 10^6 conidies/ml, formant un plateau à 68% de mortalité. Pour cette même période, on remarque aucune mortalité dans les témoins.

II. 1.1.1 EFFET DE LA TEMPERATURE.

A cause du peu de croissance et de la faible sporulation des deux souches en milieux gélosés et liquides, les essais biologiques suivants n'ont été réalisés qu'avec la souche ATCC et seulement à deux températures. Les figures 7 et 8 représentent les courbes de mortalité des larves de 2^{ème} stade d'Ae triseriatus exposées aux conidies de C. clavisporus à 20 et 25⁰ C. Toujours à cause de la faible quantité de conidies disponibles pour les essais biologiques, on n'a pas fait de témoins avec des structures autoclavées. D'ailleurs, si on regarde les résultats obtenus à la section ci-haut (fig. 5 et 6), on constate que les témoins composés de conidies autoclavées (numéro 2) possèdent des courbes de mortalité semblables aux témoins numéro 1, qui eux ne contiennent que les larves dans l'eau distillée. Egalement, contrairement à la section précédente, les essais biologiques sont réalisés en triplicata.

Si on regarde la figure 7, on remarque une grande différence de mortalité entre les concentrations et le témoin, surtout à 10^5 et 10^6 conidies/ml, alors qu'elle atteint respectivement 28 et 64% à la 9^{ième} journée d'exposition, comparativement à moins de 10% pour le témoin. A 25^0 C (fig. 8), la mortalité est moindre, mais s'élève à 21 et 28% à la 9^{ième} journée d'exposition, pour les concentrations de 10^5 et 10^6 conidies/ml, contre moins de 10% dans le témoin. On voit dans les figures 7 et 8, que les courbes de mortalité pour les différentes concentrations sont semblables. C'est à dire que pendant les premières journées d'exposition, on note peu ou pas de mortalité, ensuite, après ce "temps de latence", on assiste en l'espace de deux à trois jours à une "phase de mortalité", qui à la fin de cette période se stabilise jusqu'à la fin de l'expérience, formant un plateau sur la courbe des pourcentages moyens des mortalités cumulées.

II. 2 EVALUATION DE TOLYPOCLADIUM CYLINDROSPORUM.

II. 2.1 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR AEDES TRISERIATUS.

Dans cette section, nous présenterons les résultats des essais biologiques avec les suspensions de conidies, lors de l'exposition des larves de 2^{ième} stade d'Ae triseriatus à trois températures (18, 20 et 25^0 C), et les résultats de essais effectués à 20^0 C, sur les quatre stades larvaires d'Ae triseriatus. On regardera également, les résultats des essais biologiques avec des suspensions de blastoconidies, sur des larves de 2^{ième} stade d'Ae triseriatus en exposition continue, et aussi avec des temps de contact

différents. Pour terminer, nous verrons les résultats obtenues avec le filtrat d'un bouillon de culture de T. cylindrosporum.

II. 2.1.1 LES CONIDIES.

Après 15 jours d'exposition continue à 20° C des larves de 2^{ème} stade (fig. 9), la mortalité atteint 100% à la concentration de 10⁶ conidies/ml (elle s'élève déjà à 72% à la 5^{ème} journée d'exposition), 60% à 10⁵, 28% à 10³ et 8% à 10⁴ conidies/ml, comparativement à 12% pour les témoins. Donc une différence élevée de la mortalité, entre les témoins et les concentrations de conidies les plus élevées (10⁵ et 10⁶ conidies/ml). Si on regarde les courbes de mortalité aux concentrations de 10⁵ et 10⁶ conidies/ml, on voit une légère stabilisation des mortalités après 4-5 jours. Entre les jours 10 et 12, il y a pour la concentration de 10⁵ conidies/ml, une augmentation du taux de mortalité, et ce jusqu'à la fin de l'expérience.

II. 2.1.1.1 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

Suite aux résultats obtenus avec les conidies de T. cylindrosporum, on a réalisé des essais biologiques en faisant varier le paramètre température. On rappelle que ces essais (fig. 10, 11 et 12), contrairement à ceux effectués à la section III.2.1.1., sont en triplicata. On s'est également servi des résultats de la section précédente pour choisir la fourchette de concentrations (10⁷, 10⁶, 10⁵ et 10⁴ conidies/ml). Les témoins numéro 1, ne contiennent que les larves dans l'eau distillée, tandis que les témoins 2, contiennent une concentration de

10^7 conidies/ml autoclavées. Les figures 10, 11 et 12 montrent les résultats à 18, 20 et 25° C.

A 18° C (fig. 10), après 13 jours d'exposition continue, on a 76% de mortalité à 10^7 conidies/ml, et entre 30-50% pour les autres concentrations. Dans les témoins, on a pour cette période une mortalité de 16 et 11% (témoin 1 et 2). A 20° C (fig. 11), à la 11^{ème} journée d'exposition, la mortalité atteint 58% à 10^7 conidies/ml, de 31-46% pour les concentrations de 10^4 - 10^6 conidies/ml, et moins de 10% pour les témoins. A 25° C (fig. 12), toujours après la 11^{ème} journée d'exposition, on a 80% de mortalité à 10^7 conidies/ml, entre 17-26% pour les concentrations de 10^4 - 10^6 conidies/ml, et 1% pour nos deux témoins. Pour les trois températures, on note des différences marquées dans les mortalités, entre les suspensions de conidies et les témoins, principalement à la concentration de 10^7 conidies/ml.

On voit également que les courbes de mortalité sont assez semblables. On a une période de latence durant les premières journées (5-6 jours), ensuite on assiste à une augmentation de la mortalité, surtout à la concentration de 10^7 conidies/ml, durant la période d'observation.

II. 2.1.1.2 INFLUENCE DU STADE LARVAIRE.

Les essais biologiques suivants avaient pour but de vérifier le pouvoir pathogène des conidies de T. cylindrosporum sur des larves de 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} stade d'Ae triseriatus. Lors des essais biologiques avec les

1^{er}, 3^{ième}, et 4^{ième} stades, on a soustrait de l'expérience les témoins avec les structures autoclavées. Les résultats sont présentés aux figures 13, 14, 15 et 16. La figure 14 qui représente l'essai avec les larves de 2^{ième} stade, est de fait une répétition de la figure 11.

Pour le 1^{er} stade larvaire (fig. 13), à la concentration de 10^7 conidies/ml, on observe à la 7^{ième} et à la 11^{ième} journée, 72 et 78% de mortalité comparativement à 14 et 21% pour les témoins. Les autres courbes de mortalité, aux concentrations de 10^4 - 10^6 conidies/ml sont groupées, et après 11 jours, on obtient entre 27-32% de morts. Si on débute les essais biologiques avec le 2^{ième} stade (fig. 14), on note après 7 et 11 jours d'exposition, 28 et 58% de mortalité à 10^7 conidies/ml, et 5 et 8% pour le témoin ayant la mortalité la plus élevée. Au 3^{ième} stade larvaire (fig. 15), on a 20 (7 jours) et 74% (11 jours) à 10^7 conidies/ml, et 1 et 6% pour le témoin. Finalement, après 7 et 11 jours d'exposition à 10^7 conidies/ml, on observe avec les larves de 4^{ième} stade (fig. 16) des mortalités cumulées de 45 et 97% comparativement à 1 et 5% pour le témoin. Il est important de noter que les concentrations de conidies pour l'essai avec le 4^{ième} stade larvaire (fig. 16) sont quatre fois plus élevées que celles des essais avec les autres stades larvaires.

Pour l'ensemble des stades, on remarque une très forte mortalité pour la concentration de 10^7 conidies/ml, tandis que la concentration de 10^6 conidies/ml ne dépasse les 50% de mortalité qu'avec les larves de 3^{ième} stade.

II. 2.1.2 LES BLASTOCONIDIES.

La figure 17 montre les résultats obtenus lorsqu'on expose des larves de 2^{ème} stade d'*Ae triseriatus* à différentes concentrations de blastoconidies de *T. cylindrosporum*. On observe à 4 jours d'exposition, une mortalité de 100% à 10^7 blastoconidies/ml; de 89% à 10^6 ; de 24% à 10^5 ; de 9% à 10^4 comparativement à 5% pour les deux témoins. A la 11^{ème} journée, les mortalités s'élèvent à 99% à 10^6 blastoconidies/ml; à 80% à 10^5 ; à 31% à 10^4 ; par rapport à 17 et 10% pour les témoins 1 et 2. Le témoin 1, comme lors de tous les essais biologiques, ne contient que les larves dans l'eau distillée, tandis que le témoin 2 renferme une suspension de 10^6 blastoconidies/ml.

Si on regarde les courbes de mortalité des différentes concentrations, on voit que plus la concentration en blastoconidie est élevée, plus la réponse est rapide (temps de latence plus court) et forte (mortalité plus élevée).

II. 2.1.2.1 INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT.

Pour ces essais biologiques avec deux concentrations de blastoconidies et des temps de contact différents (fig. 18 et 19), on n'a fait qu'un seul témoin, qui ne contient que des larves dans l'eau distillée. Notre décision de soustraire un témoin avec des structures autoclavées, est basée sur les résultats de la figure 17, où les mortalités associées au témoin 2, suivent ou sont inférieures à celles du témoin 1. Egalement, les essais biologiques ont été

interrompus après 4-5 jours, parce que la mortalité était élevée dans les témoins.

On note (fig. 18) une forte mortalité à tous les temps de contact pour la concentration de 10^6 blastoconidies/ml. Evidemment, les plus fortes mortalités sont obtenues lors des expositions continues; après 48 heures à 10^6 blastoconidies/ml, toutes les larves sont mortes. Pour cette même période, on note pour 6 heures de temps de contact, 89% de mortalité et entre 45-60% pour les temps de 15, 30 min., 1 et 2 heures, comparativement à 4% pour le témoin. Au jour 4, c'est 97% pour 6 heures de temps de contact; de 57-77% pour les autres temps et 18% pour le témoin. Si on jette un coup d'oeil sur les différents temps de contact avec une concentration de 10^7 blastoconidies/ml (fig. 19), on observe à 2 jours, 95% de mortalité en continu; 87% à 6 heures; entre 54-68% de 15 minutes à 2 heures et 8% pour le témoin. A la 4^{ème} journée, les mortalités sont de 100% en continu; 99% pour 6 heures; de 80-89% entre 15 minutes et 2 heures, et 36% pour le témoin.

Egalement, nous remarquons pour les deux concentrations de blastoconidies (fig. 18 et 19), que la mortalité s'élève très rapidement et ce, dès les premières journées, et pour toutes les courbes de mortalité.

II. 2.1.3 LE FILTRAT DE CULTURE.

La figure 20 montre les résultats obtenus avec le filtrat d'un bouillon de culture. Notons que la croissance de T. cylindrosporum a duré 26 jours, avant que l'on procède à l'extraction du filtrat. On observe une très forte mortalité aux dilutions de 1/10 et 1/20, avec respectivement 95 et 77% de mortalité cumulée à la 3^{ème} journée d'exposition continue, alors que cette mortalité ne s'élève qu'à 11 et 2% dans les témoins des dilutions, et qu'elle est nulle dans celui ne contenant que les larves dans l'eau distillée. Nous avons arrêté l'essai biologique après trois jours, parce qu'il y avait une forte turbidité causée par le développement de bactéries, surtout dans les témoins renfermant du milieu de culture Sabouraud-Dextrose, ce qui rendait les lectures des larves mortes et vivantes difficiles.

II. 2.2 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR SIMULIES.

Cette partie traite des résultats obtenus lors des essais biologiques réalisés avec des larves de similies. Nous verrons les résultats des expériences réalisées au laboratoire à 10⁰ C, avec des suspensions de conidies et de blastoconidies, et ceux de l'essai biologique effectué sur le terrain dans le système de gouttières.

II. 2.2.1 ESSAIS EN LABORATOIRE SUR SIMULIUM VITTATUM.

Un premier essai biologique fut réalisé pour vérifier la pathogénécité de T. cylindrosporum sur les larves de similies. Nous avons placé les larves de S. vittatum en contact continu, à différentes concentrations de conidies de T. cylindrosporum. A la figure 21, nous voyons des mortalités importantes enregistrées avec les conidies de T. cylindrosporum. A la 9^{ième} journée d'exposition, on note 70% de mortalité cumulée à la concentration de 10^6 conidies/ml, 19% à 10^4 conidies/ml, comparativement à 2% pour le témoin 2 qui contient une suspension de 10^6 conidies autoclavées/ml, et aucune mortalité pour le témoin 1 avec seulement les larves dans l'eau distillée. Aucune mortalité n'est observée pendant cette même période avec la suspension de 10^2 conidies/ml. On constate une période de latence d'environ 5-6 jours avant l'apparition de la mortalité, qui augmente par la suite jusqu'à la fin de l'essai biologique. Cependant, à partir de la 9^{ième} journée et jusqu'à la fin de l'expérience, nous avons une forte croissance de la mortalité dans le témoin 2, qui peut s'expliquer par le développement d'une importante flore bactérienne dans le contenant.

Suite à ces résultats, nous avons fait deux autres essais, en triplicata; un avec des suspensions de conidies et l'autre avec des blastoconidies de T. cylindrosporum. La figure 22 présente les données obtenues avec les conidies de T. cylindrosporum. On s'aperçoit que les courbes de mortalité des suspensions de 10^5 , 10^4 et 10^3 conidies/ml ne diffèrent pas de celles des témoins. Après 12 jours, on a entre 20-33% de mortalité pour les

concentrations de 10^3 - 10^5 conidies/ml; 48% pour le témoin numéro 1 et 42% pour le numéro 2, contenant une suspension d'une concentration de 10^6 conidies autoclavées/ml. Une légère différence d'avec les témoins s'observe pour la même période, à 10^6 conidies/ml, avec 61% de mortalité.

Cependant, dans le cas des blastoconidies (fig. 23), on voit que les suspensions se démarquent des témoins. Après 18 jours de contact, on note 80% de mortalité à 10^6 blastoconidies/ml, 49% à 10^5 blastoconidies/ml, et 32% pour les concentrations de 10^3 et 10^4 blastoconidies/ml, contre 22 et 20% pour les témoins.

Encore une fois, tant à la figure 22 que 23, on constate qu'il y a un temps de latence de l'ordre de 4-5 jours dans les courbes de mortalité, suivi d'une augmentation constante de la mortalité.

II. 2.2.2 ESSAIS SUR LE TERRAIN SUR SIMULIUM CORBIS.

Suite aux résultats de laboratoire, on a fait un essai biologique sur le terrain avec deux doses de blastoconidies de T. cylindrosporum (5×10^{10} et 5×10^9 blastoconidies. L^{-1} .sec), et un temps de contact de 30 minutes. L'essai s'est effectué entre le 27 mai et le 7 juin 1989, et l'espèce présente sur le terrain était Simulium corbis Twinn. Les températures moyennes minimale et maximale de l'eau étaient de $13,5^{\circ}C$ (étendue de 12-14,5) et $17,2^{\circ}C$ (étendue de 15-19,0). A la figure 24, on observe que les courbes de mortalité ne sont pas très élevées. Après 5 jours, nous avons près de 20% de mortalité à la dose

de 5×10^{10} blastoconidies.L⁻¹.sec, 4% à 5×10^9 blastoconidies.L⁻¹.sec, et 1% pour le témoin. Les mortalités correspondent à celles des larves, nous n'avons jamais trouvés d'adultes morts ou de cocons infectés. Effectivement, 97,4% des larves mortes à la dose de 5×10^{10} blastoconidies.L⁻¹.sec, et 100% à celle de 5×10^9 blastoconidies.L⁻¹.sec ont été récoltées dans les filets de dérive. De plus, on remarque que les mortalités augmentent jusqu'à la 5^{ème} journée, où elles atteignent un plateau jusqu'à la fin de l'expérience.

II. 3 ISOLATION DES MYCETES PROVENANT D'OEUF, DE LARVES ET D'ADULTES DE SIMULIES.

Les techniques et les milieux de cultures mentionnés dans le chapitre matériel et méthode, ont permis d'isoler et de purifier à partir des oeufs, des larves et des adultes de similies une vingtaine de souches mycéliennes. Le tableau 3 donne le groupe, le genre et/ou l'espèce des isolats identifiés à ce jour, ainsi que leur provenance.

Dans le tableau 3, on trouve les genres Saprolegnia, Fusarium, Acremonium, Mortierella, Phoma et des Entomophthorales. Ce dernier groupe de mycètes a retenu notre attention, car nous avons trouvé des épizooties chez des adultes de similies pendant deux années consécutives. D'ailleurs, on retrouvera dans la dernière partie de ce chapitre, les observations sur les Entomophthorales. Les deux autres parties de cette section traiteront de la virulence de trois des isolats du tableau 3 (6J, 44 et B) sur des larves de moustiques et de similies.

II. 3.1 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR AEDES TRISERIATUS.

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué le pouvoir larvicide de trois Hyphomycètes, en exposant des larves de 2^{ième} stade d'Ae triseriatus à différentes suspensions de conidies de ces mycètes. Le témoin numéro 2 contenait une concentration de 10^6 conidies autoclavées/ml, et le témoin 1 de l'eau distillée. De ces tests, nous avons obtenu une faible mortalité pour l'ensemble des souches, et à toutes les concentrations. Après 12 jours d'exposition la valeur maximale atteinte pour l'ensembles des essais biologiques, et pour les trois mycètes, est de 11% pour 6J à 10^7 conidies/ml (témoin 1 et 2; 1 et 7%).

Une autre série d'essais biologiques ont été faits en exposant cette fois-ci, les larves d'Ae triseriatus à des dilutions de 1/10, 1/20 et 1/100 des filtrats de milieu de culture des trois mycètes. Les filtrats ont été extraits des bouillons de culture des mycètes après 20-30 jours de croissance. Nous avons déterminé cette période en fonction des résultats intéressants obtenus avec le filtrat de culture de T. cylindrosporum. Encore une fois, si on compare les mortalités obtenues avec celles des témoins, on note que la différence est faible. A des dilutions de 1/10, on obtient 20% de mortalité pour B, contre 35% pour le témoin contenant une dilution 1/10 du milieu de culture, et 18% pour celui avec seulement les larves dans l'eau distillée. Pour la souche 44, c'est 12% avec une dilution de 1/10, contre 1% pour les témoins. Par contre, la figure 25 présente des résultats encourageants pour 6J. Après 12 jours

d'exposition, nous obtenons 87% de mortalité à la dilution de 1/10, et 23% à 1/20, alors que la mortalité dans les témoins est inférieure à 5%. Déjà après deux jours d'exposition, la mortalité s'élevait à plus de 70% à la dilution de 1/10 (fig. 21). Suite à ces résultats, un autre essai biologique a été réalisé avec un autre filtrat de culture de 6J. Cette fois-ci, on a exposé les larves à des dilutions de 1/5, 1/10 et 1/20 du filtrat. Cependant, après 12 jours d'exposition continu, on avait seulement 28%, 1% et 4% de mortalité aux dilutions de 1/5, 1/10, 1/20; 18% pour le témoin avec les larves dans l'eau distillée; 3% pour celui d'une dilution de 1/5 et 14% pour le témoin de la dilution de 1/10. Notons que lors du 1^{er} essai avec la souche 6J, nous avons extrait le filtrat de culture après 27 jours de croissance du mycète dans le bouillon de culture, et après 22 jours pour le 2^{ième} essai biologique.

II. 3.2 ESSAIS BIOLOGIQUES SUR SIMULIUM CORBIS.

Des trois souches évaluées sur moustiques, les conidies des Acremonium (6J et B) ont été produites en quantité suffisante pour réaliser des essais biologiques sur simuliés dans le système de gouttières. Les essais ont eu lieu à la même période que l'essai biologique avec les blastoconidies de T. cylindrosporum. Les larves de S. corbis étaient exposées pendant 30 minutes à deux doses de conidies (5×10^{10} et 5×10^9 conidies.L⁻¹.sec) de chaque mycète. On a observé des mortalités faibles pour nos deux souches. A 12 jours, on avait pour les deux doses, 5 et 6% de mortalité pour B, et 10 et 7% pour 6J, comparativement à 4% pour le témoin. Tout comme lors de l'essai avec

les blastoconidies de T. cylindrosporum dans le système de gouttières, les larves mortes étaient trouvées dans les filets de dérive.

II. 3.3 EPIZOOTIES A ENTOMOPHTHORALES.

Suite à la découverte d'adultes (printemps 1988) présentant des mycoses à Entomophthorales, au ruisseau Castor Noir, nous avons visité à l'été 1989, d'autres sites à simuliés de la Réserve faunique du St-Maurice. La carte de la figure 26 présente les lieux et les dates des découvertes des adultes de simuliés tués par des Entomophthorales. On a retrouvé des entomophthoroses dans huit cours d'eau différents.

Au Castor Noir (site 5, fig. 26), des adultes morts de mycoses ont été trouvés le 16 juin 1988, le 20 juin, le 28 juin et le 12 juillet 1989. La section du ruisseau Castor Noir, où ont été effectuées nos recherches, se situe à la décharge du lac Inman est (fig. 27a). La décharge du lac Eveline (site 3, fig. 27b), fut visitée le 28 juin, le 12 juillet et le 8 août 1989, et on a trouvé des individus infectés le 28 juin et le 12 juillet, mais pas le 8 août. A cette date, le niveau d'eau du lac Eveline s'étant abaissé, il n'y avait presque plus d'eau à la décharge, et donc assèchement du milieu. Le site numéro 6 (fig. 26), représente la décharge du lac Konke, où se trouve un barrage. Nous avons découvert des individus tués par des mucètes en amont et en aval du barrage (fig. 27c) à nos deux visites, soit le 12 juillet et le 8 août. Les autres sites (1, 2, 4, 7, et 8, fig. 26), ont été visités le 28 juin et/ou le 12 juillet 1989. Des

simulies infectées ont également été trouvées, mais en quantité moindre qu'au Castor Noir, lac Eveline et Konke.

Nous avons donc trouvé des simulies infectées par des Entomophthorales le 16 juin 1988, et en 1989, du 20 juin au 9 août. Il est intéressant de noter que certains sites sont distants d'au moins 20 km à vol d'oiseau (fig. 26). De plus, même si nous n'avons pas fait de mesure d'incidence de la mycose (% d'individus tués par les mycètes) aux divers sites, nous avons tout de même remarqué, qu'aux trois sites principaux (Castor Noir, lac Eveline et Konke), la quantité la plus élevée d'individus morts de mycoses était le 12 juillet 89.

Les individus morts de mycoses étaient fixés sur différents substrats (fig. 28) flottant à la surface de l'eau (feuilles de plantes aquatiques et d'arbres) ou émergeant de l'eau (roches, barrage, etc). Sur ces substrats, les simulies infectées étaient toujours situées aux endroits offrant une forte humidité. De plus, dans la majorité des cas, les simulies tuées par le mycète étaient fixées sur des masses d'oeufs de simulies (fig. 28 A et B, et fig. 29). Toutefois, nous n'avons pu déterminer si ces oeufs avaient été pondus par des simulies infectées.

Les simulies récoltées au Castor Noir, à la décharge du lac Eveline et au barrage du lac Konke, appartiennent à l'espèce S. venustum/verecundum. Les simulies des autres sites n'ont pas encore été identifiées. Toutes les simulies infectées étaient adultes, et le mycète formant une masse blanche

cotonneuse, enveloppait complètement les cadavres ne laissant apercevoir que la partie dorsale du thorax (fig. 29). Dans certains cas, comme à la figure 28 A, les ailes étaient dégagées, et en position surélevées. Ultérieurement la dissection des individus devrait être réalisée pour déterminer et décrire les structures associées au groupe des Entomophthorales (cystides, rhyzoïdes, conidiophores, spores durables).

Tel que mentionné au chapitre matériel et méthode, les simuliées tuées par une Entomophthorale étaient placées en chambre humide pour la sporulation et la mise en culture du mycète, selon la méthode proposée par Papierok (1986). Toutefois, cette technique n'a pas été utilisée pour les individus de l'été 1988. Pour ces derniers, nous avons placé des morceaux d'hyphes et des individus au complet, sur les milieux de culture. Le tableau 3 donne les espèces mycéliennes isolées. A partir de chacun des échantillons récoltés aux différents sites et aux différentes dates de l'été 89, des cultures mycéliennes en milieu gélosé et liquide ont été obtenues à partir des conidies. Trois espèces d'Entomophthorales ont été isolées: Erynia sp., Erynia conica (Nowakowski) Remaudière & Hennebert et un Conidiobolus sp.. Le Conidiobolus n'a été retrouvé que chez deux individus. Dans un de ces deux cas, il était associé à une Erynia. Actuellement, nous attendons les résultats définitifs des identifications.

Tableau 3

Nom et provenance des différentes souches de mycètes
isolées de simuliés.

Provenance	Genre ou espèce
Larves de <u>Simulium vittatum</u> (automne 1987)	<u>Acremonium kiliense</u> Grutz <u>Fusarium moniliforme</u> Sheldon (44) <u>Saprolegnia diclina</u> Humphrey
Adultes de <u>Simulium venustum/verecundum</u> (printemps 1988)	<u>Acremonium</u> sp. (6J) <u>Fusarium oxysporum</u> <u>Mortierella elongata</u> Linnemann <u>Mortierella</u> sp.
Oeufs de simuliés	<u>Acremonium bactrocephalum</u> Gams (B) <u>Ascochyta</u> sp. <u>Fusarium avenaceum</u> (Corda et Fries) Saccardo <u>Phoma</u> sp.
Adultes de <u>Simulium venustum/verecundum</u> (printemps-été 1989)	<u>Erynia conica</u> (Nowakowski) Remaudière et Hennebert <u>Erynia</u> sp. <u>Conidiobolus</u> sp.

Figure 5. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Culicinomyces clavisporus (UAMH). (témoin 2; $3,0 \times 10^5$ conidies autoclavées/ml).

Figure 6. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Culicinomyces clavisporus (ATCC). (témoin 2; $3,5 \times 10^5$ conidies autoclavées/ml).

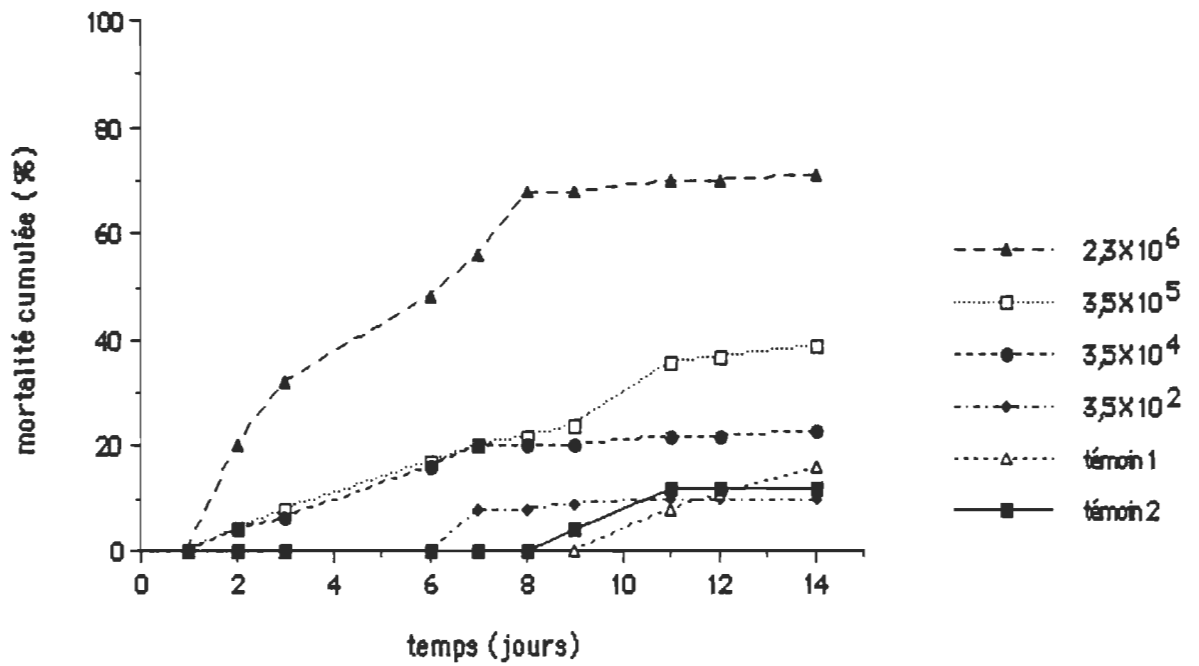
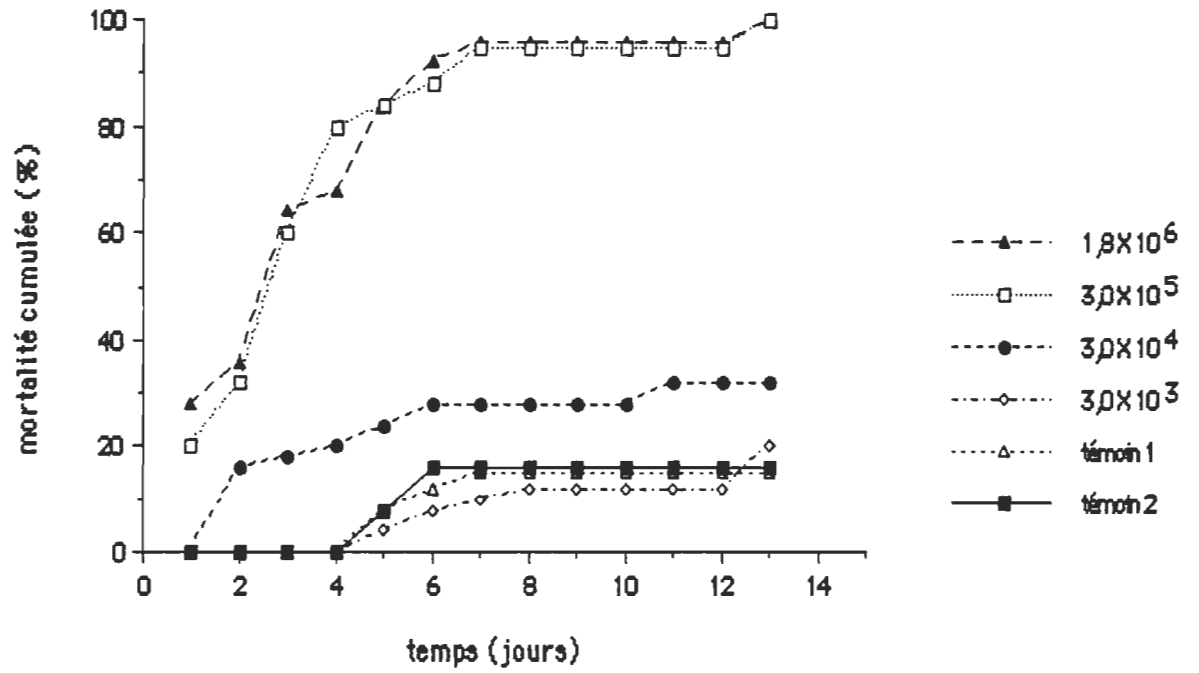


Figure 7. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Culicinomyces clavisporus (ATCC), à 20° C.

Figure 8. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Culicinomyces clavisporus (ATCC), à 25° C.

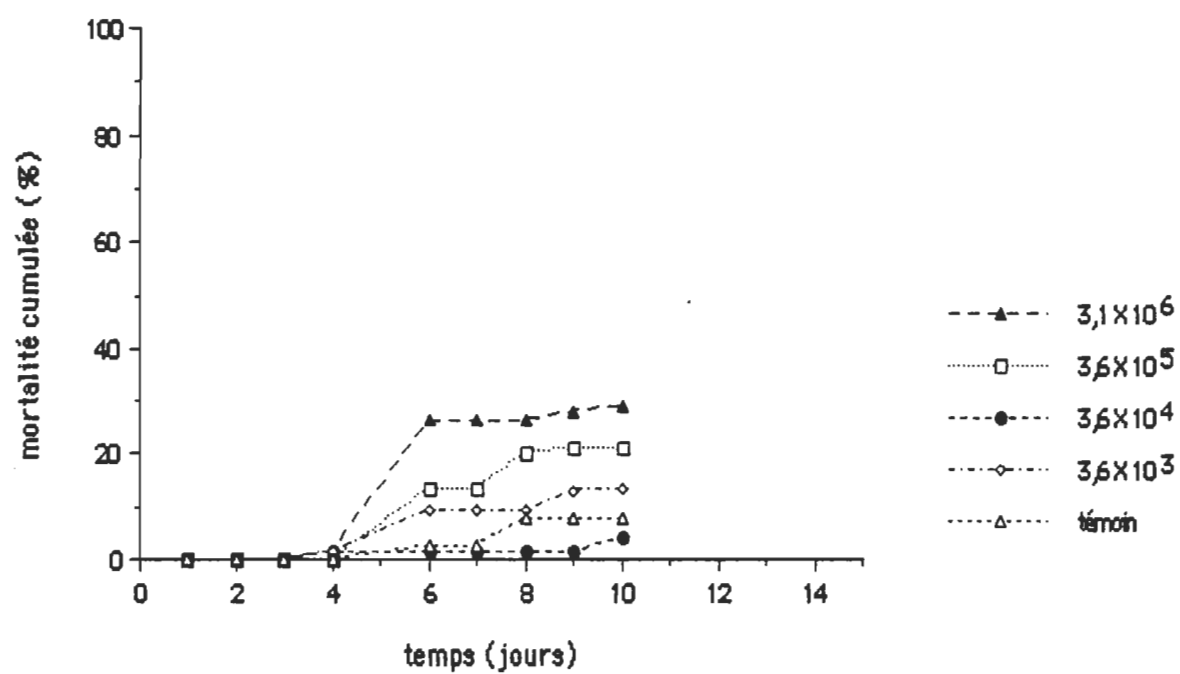
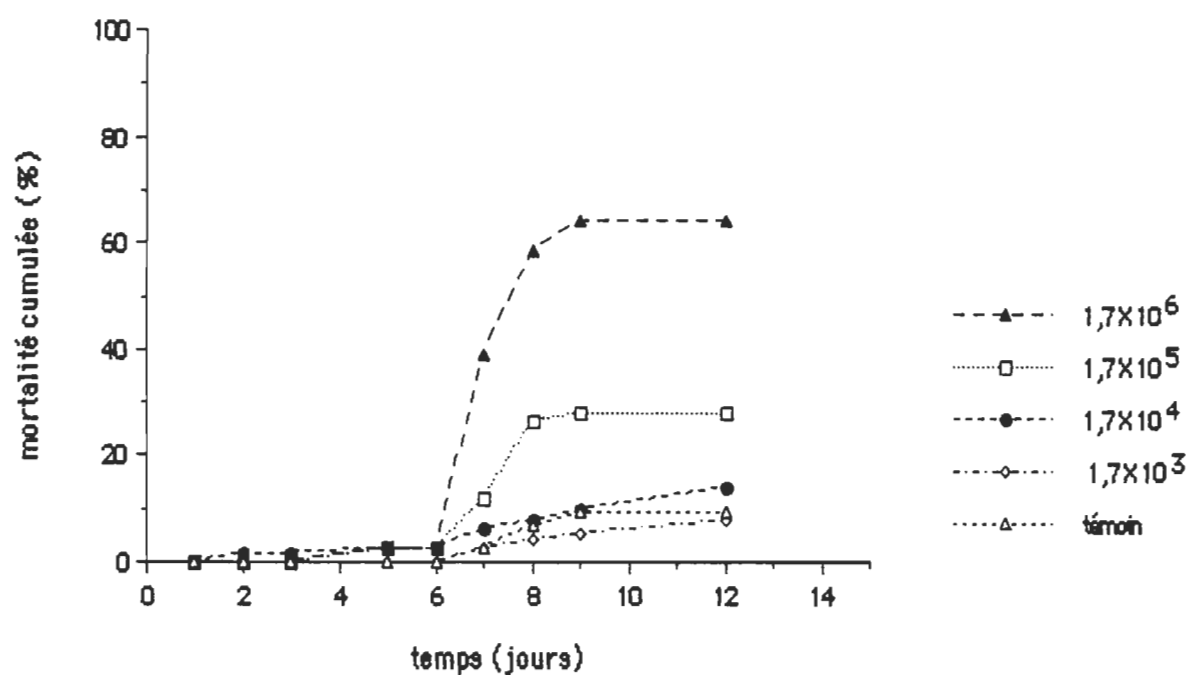


Figure 9. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum. (témoin 2; $2,3 \times 10^5$ conidies autoclavées/ml).

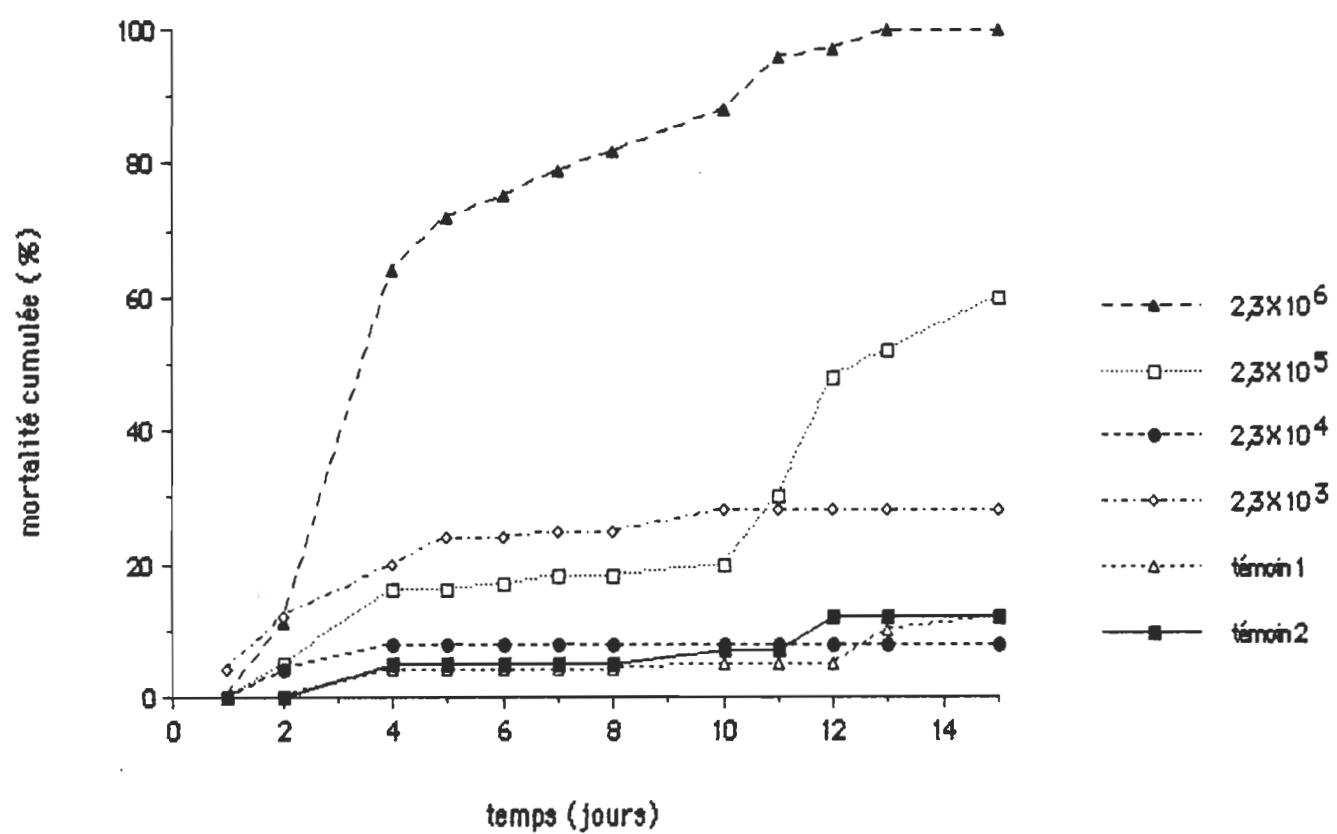


Figure 10. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum, à 18⁰ C. (témoin 2; $1,0 \times 10^7$ conidies autoclavées/ml).

Figure 11. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum, à 20⁰ C. (témoin 2; $1,0 \times 10^7$ conidies autoclavées/ml).

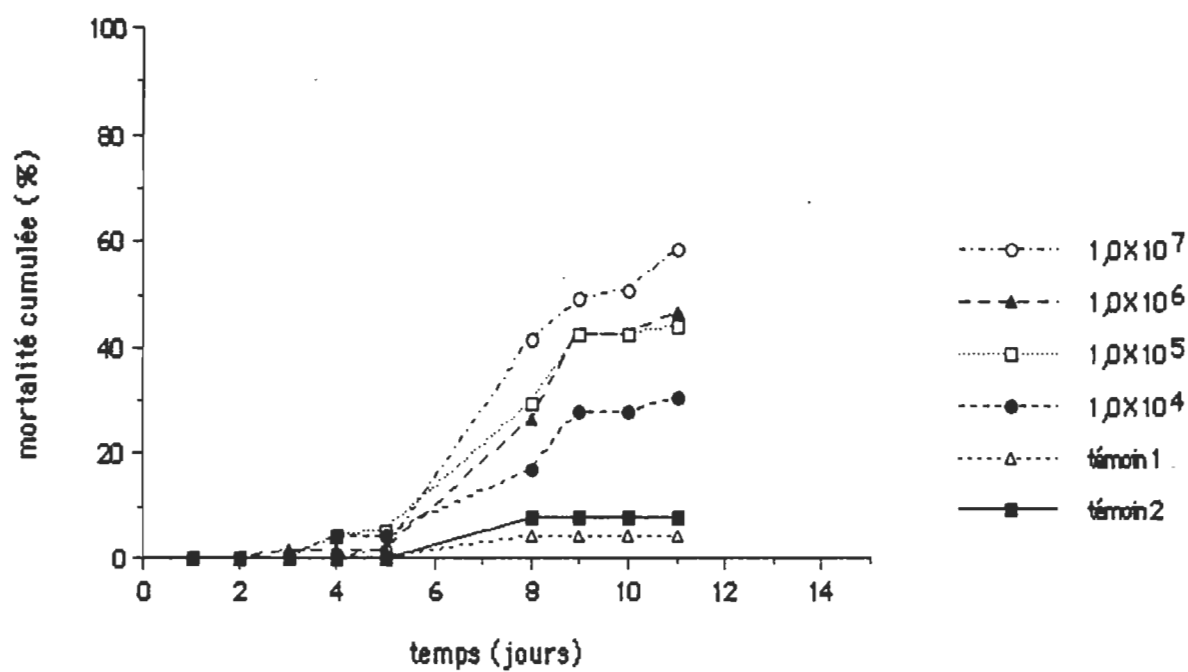
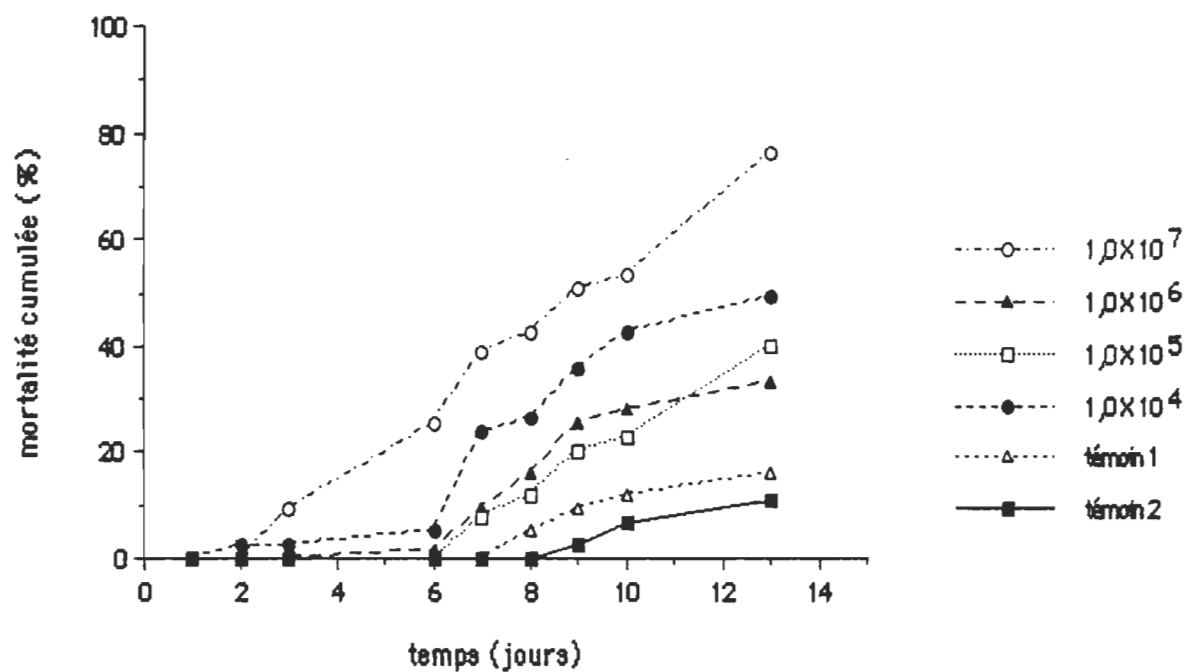


Figure 12. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum, à 25⁰ C. (témoin 2; $1,0 \times 10^7$ conidies autoclavées/ml).

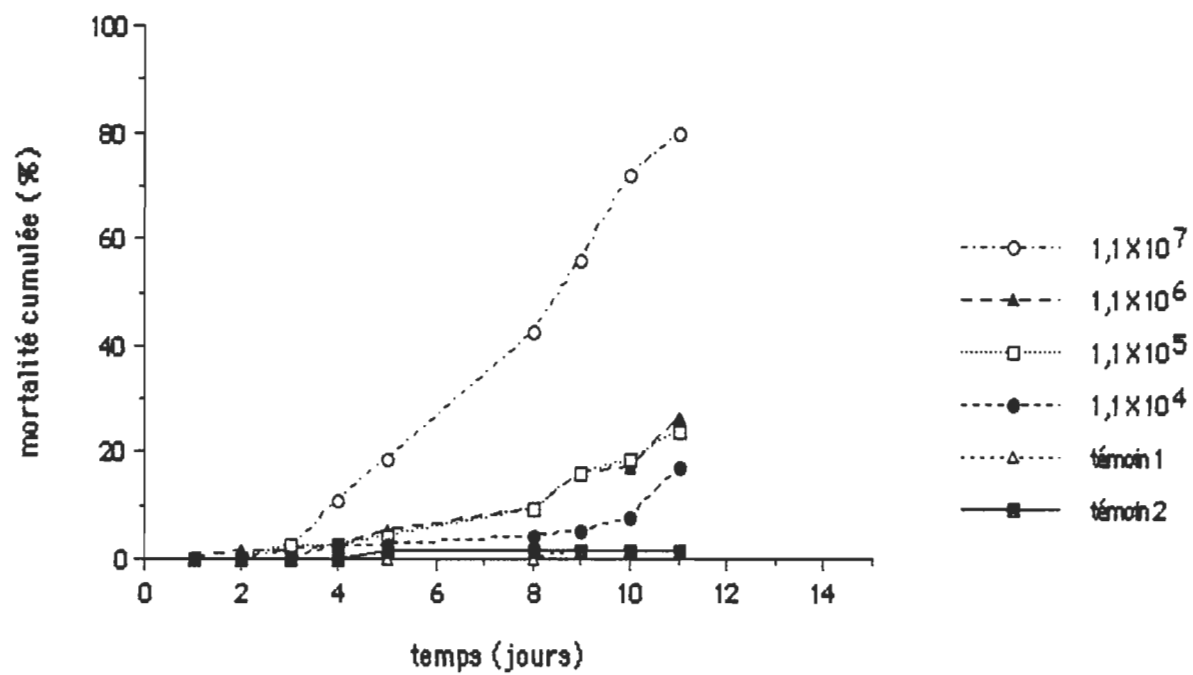


Figure 13. Mortalité des larves de 1^{er} stade d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum.

Figure 14. Mortalité des larves de 2^{ième} stade d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum. (témoin 2; $1,0 \times 10^7$ conidies autoclavées/ml).

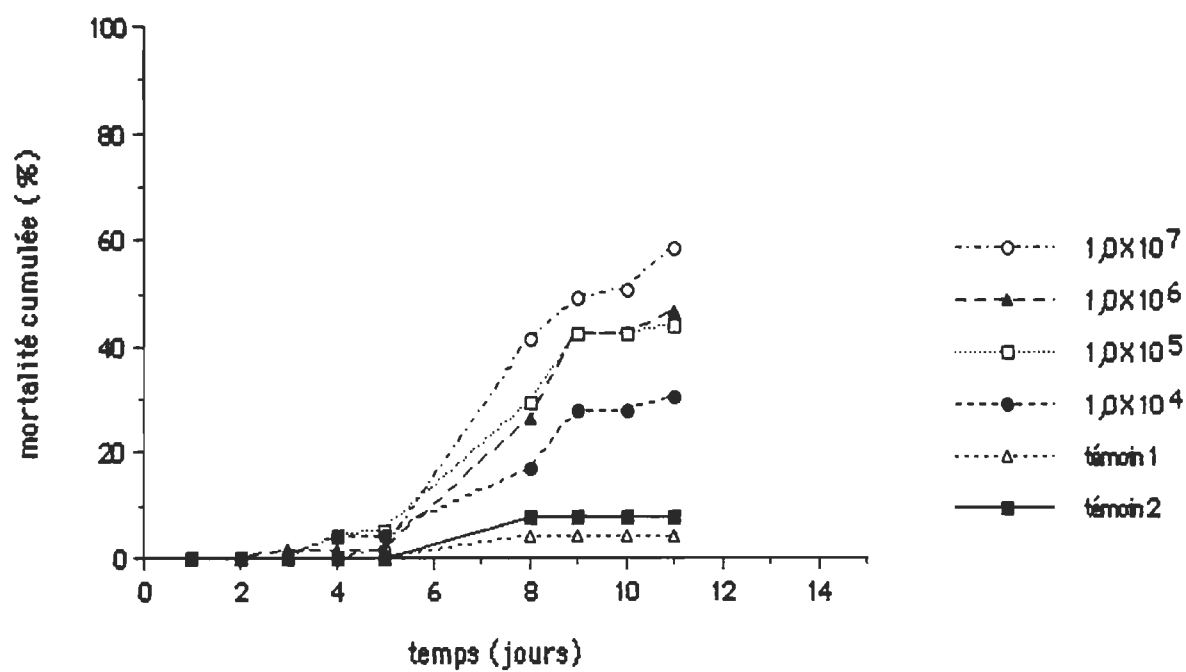
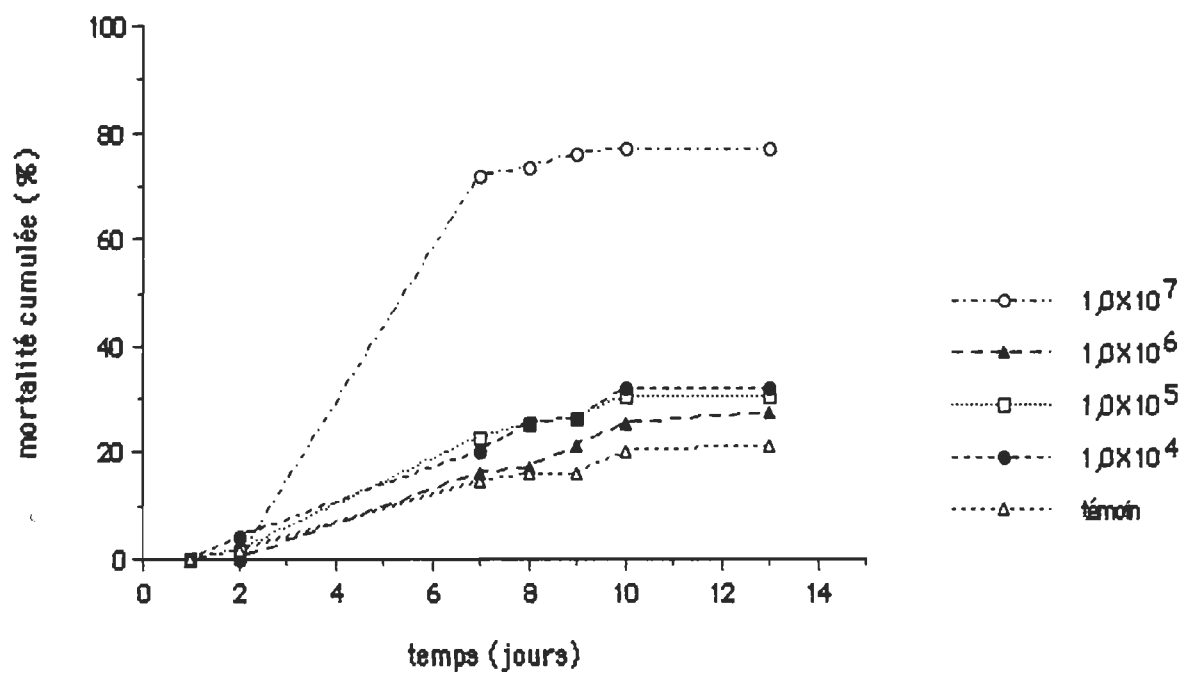


Figure 15. Mortalité des larves de 3^{ième} stade d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum.

Figure 16. Mortalité des larves de 4^{ième} stade d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum.

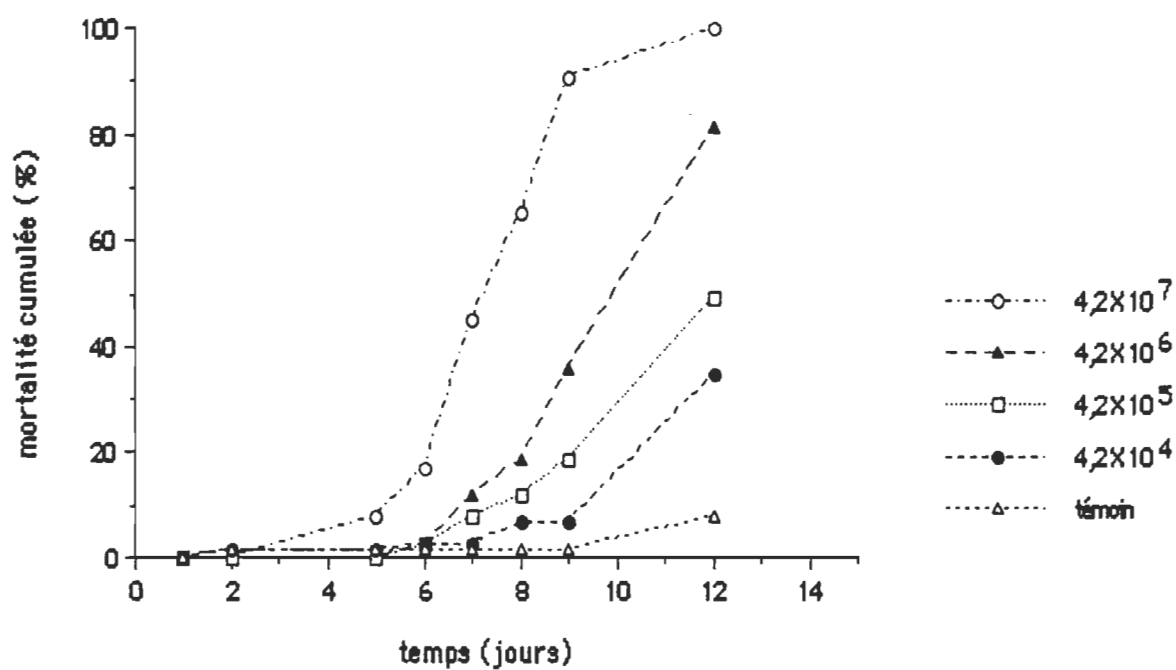
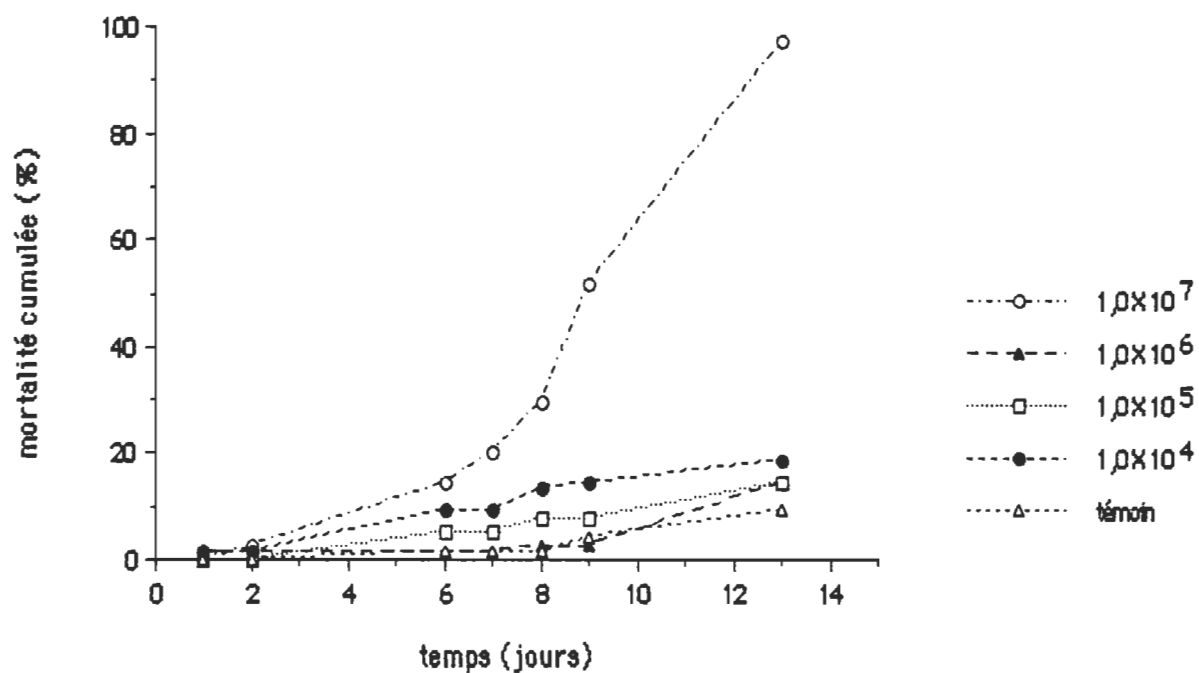


Figure 17. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes concentrations de blastoconidies de Tolypocladium cylindrosporum. (témoin 2; $1,1 \times 10^6$ blastoconidies autoclavées/ml).

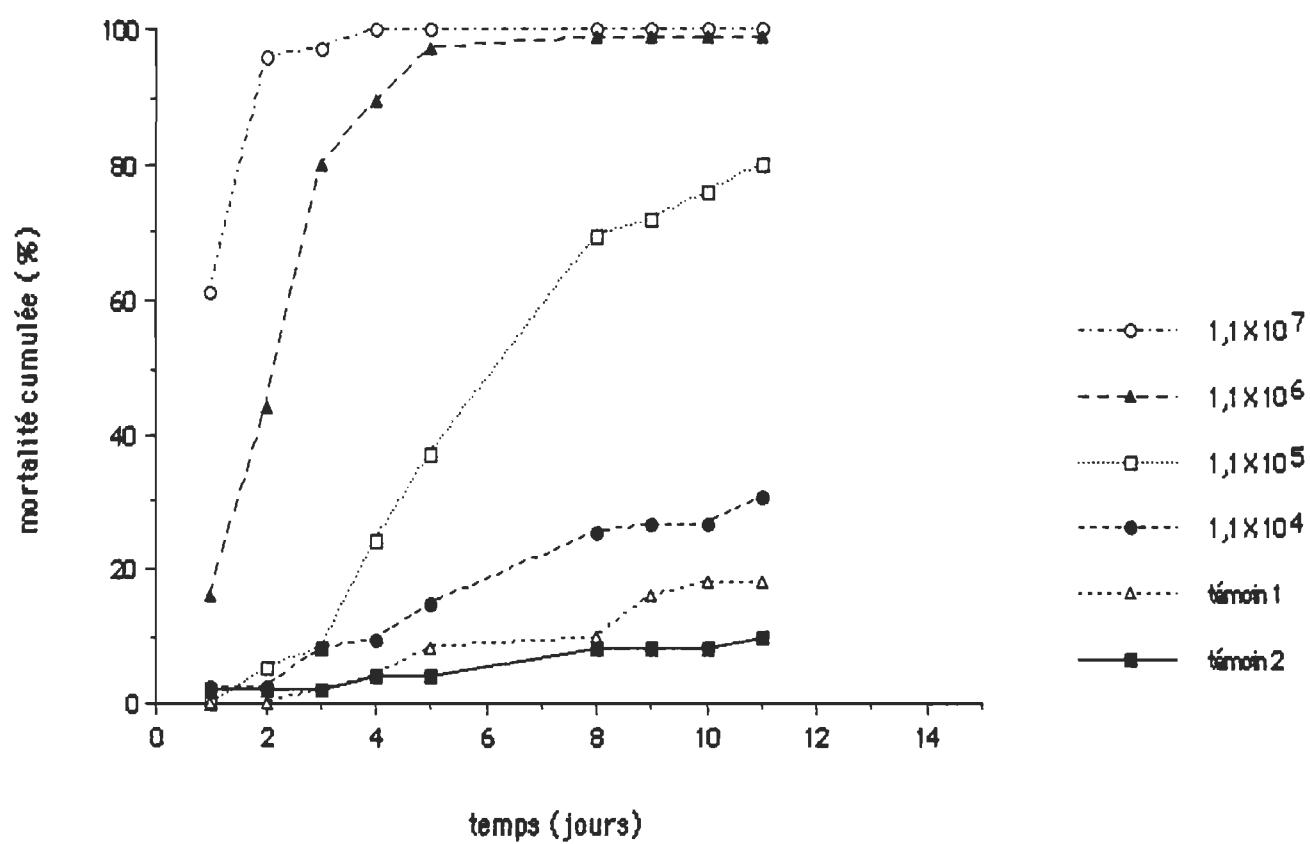


Figure 18. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus à différents temps d'exposition, dans une suspension de $1,6 \times 10^6$ blastoconidies/ml de Tolypocladium cylindrosporum.

Figure 19. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus à différents temps d'exposition, dans une suspension de $1,6 \times 10^7$ blastoconidies/ml de Tolypocladium cylindrosporum.

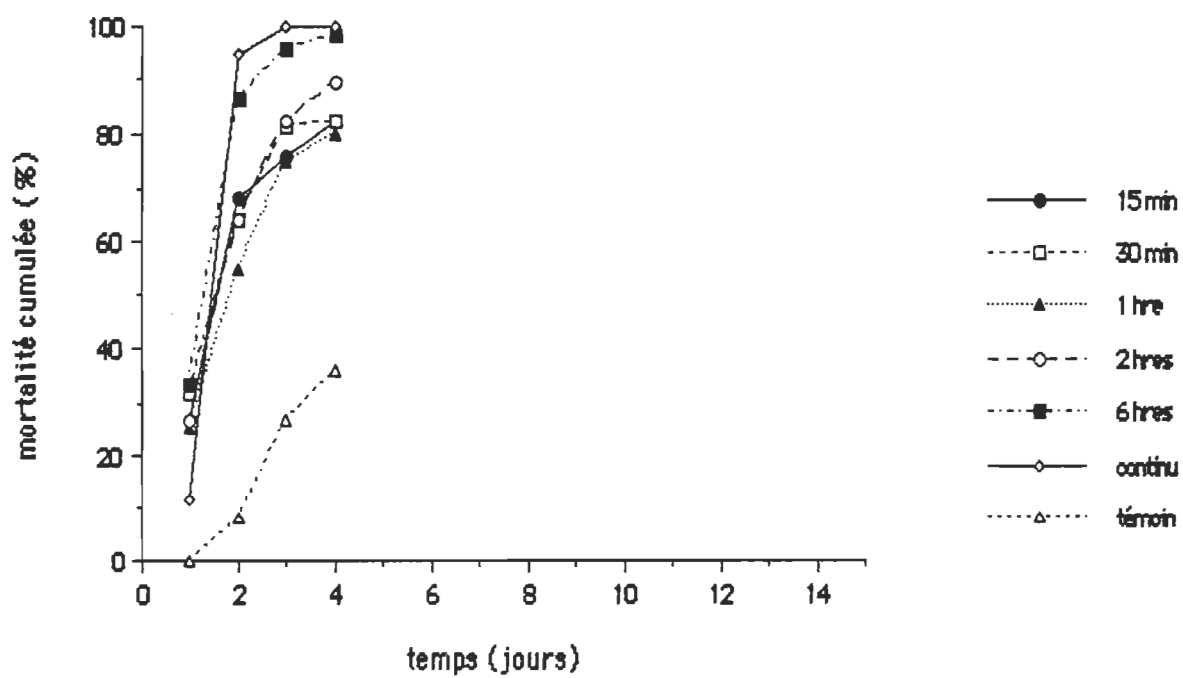
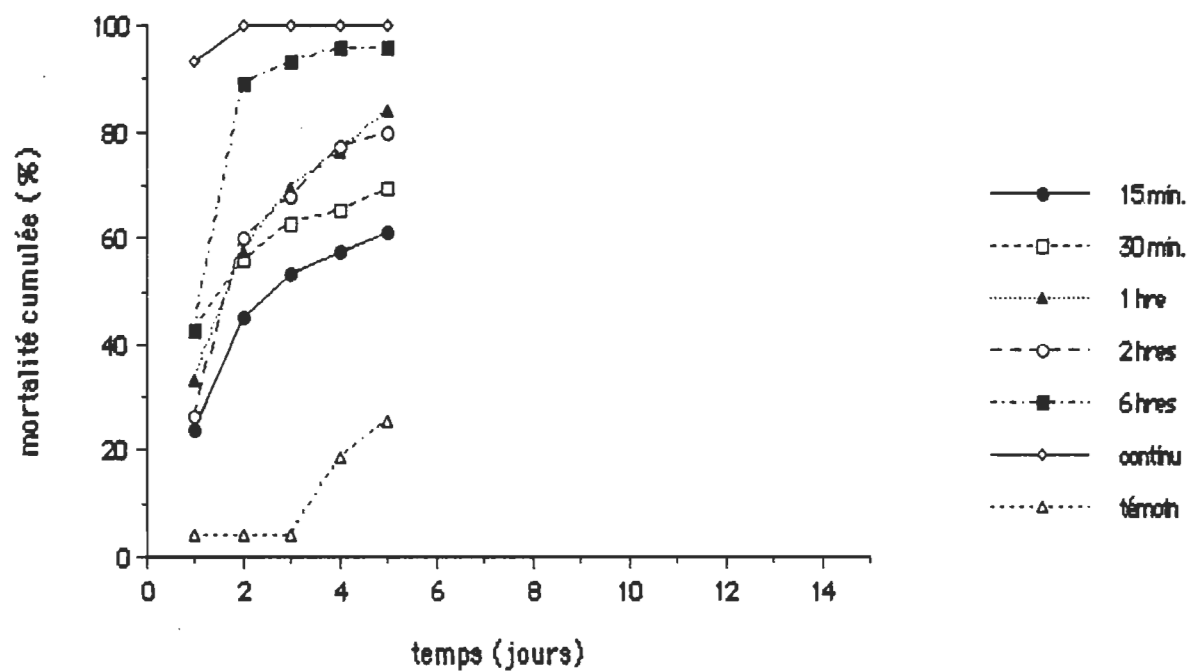


Figure 20. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes dilutions d'un filtrat de culture de Tolypocladium cylindrosporum.

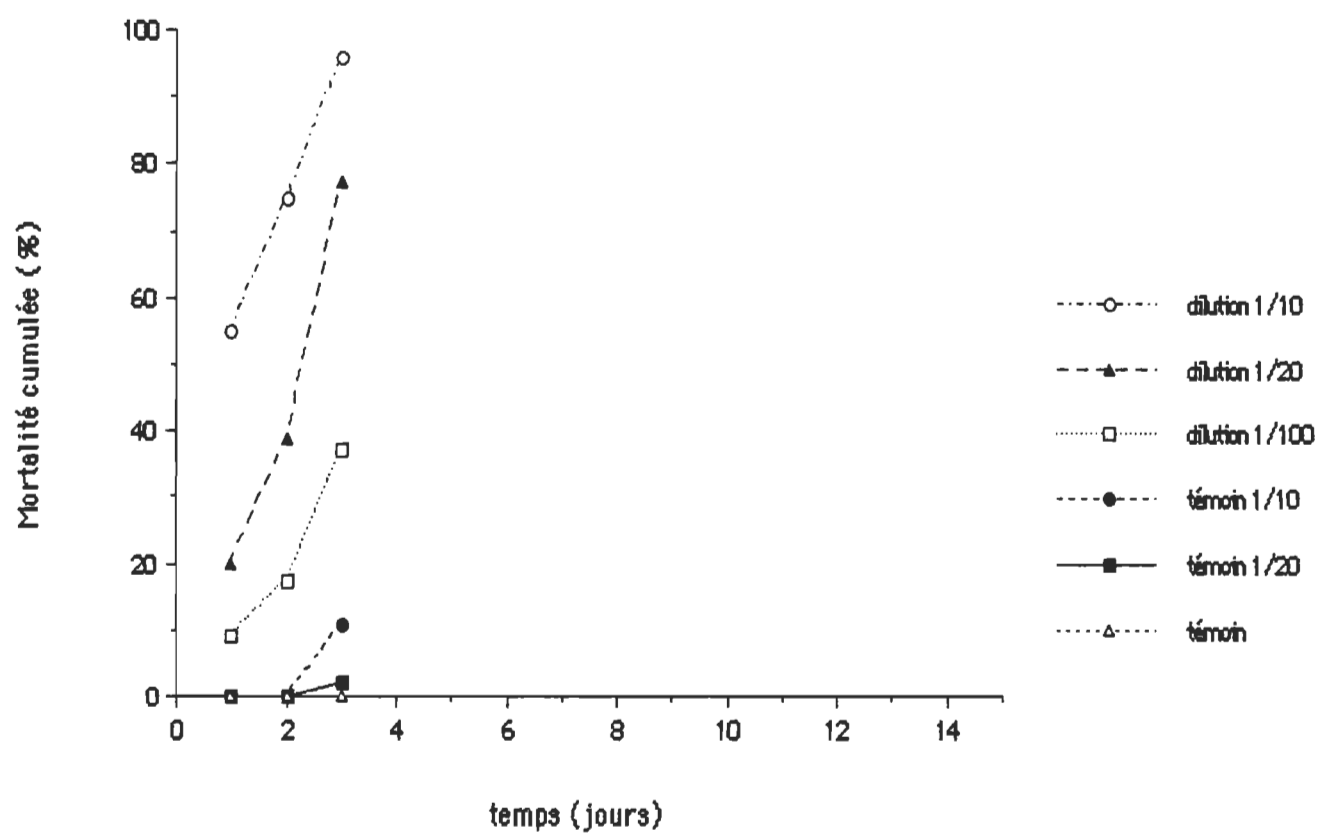


Figure 21. Mortalité des larves de Simulium vittatum exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum. (préliminaire) (témoin 2; $7,4 \times 10^6$ conidies autoclavées/ml).

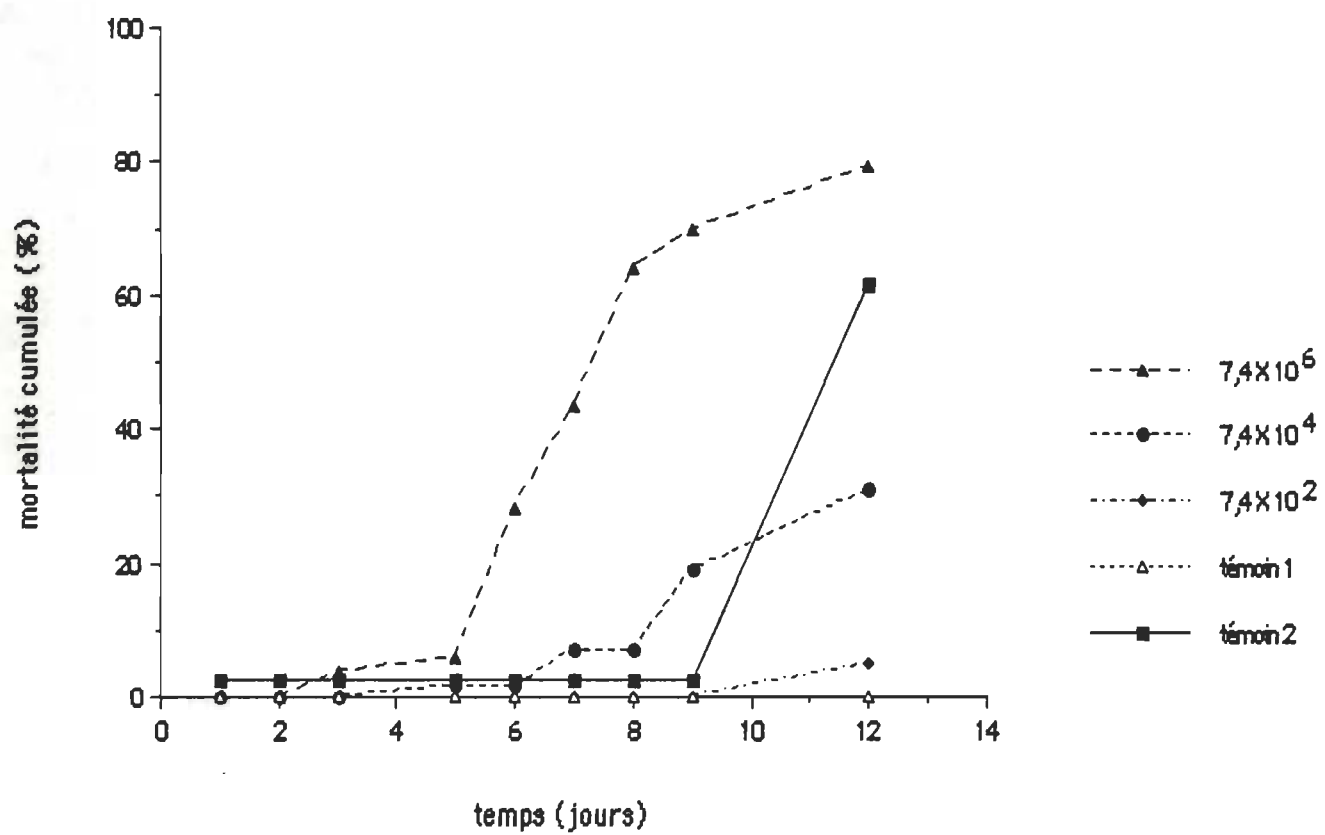


Figure 22. Mortalité des larves de Simulium vittatum exposées à différentes concentrations de conidies de Tolypocladium cylindrosporum. (témoin 2; $1,9 \times 10^6$ conidies autoclavées/ml).

Figure 23. Mortalité des larves de Simulium vittatum exposées à différentes concentrations de blastoconidies de Tolypocladium cylindrosporum. (témoin 2; $1,3 \times 10^6$ blastoconidies autoclavées/ml).

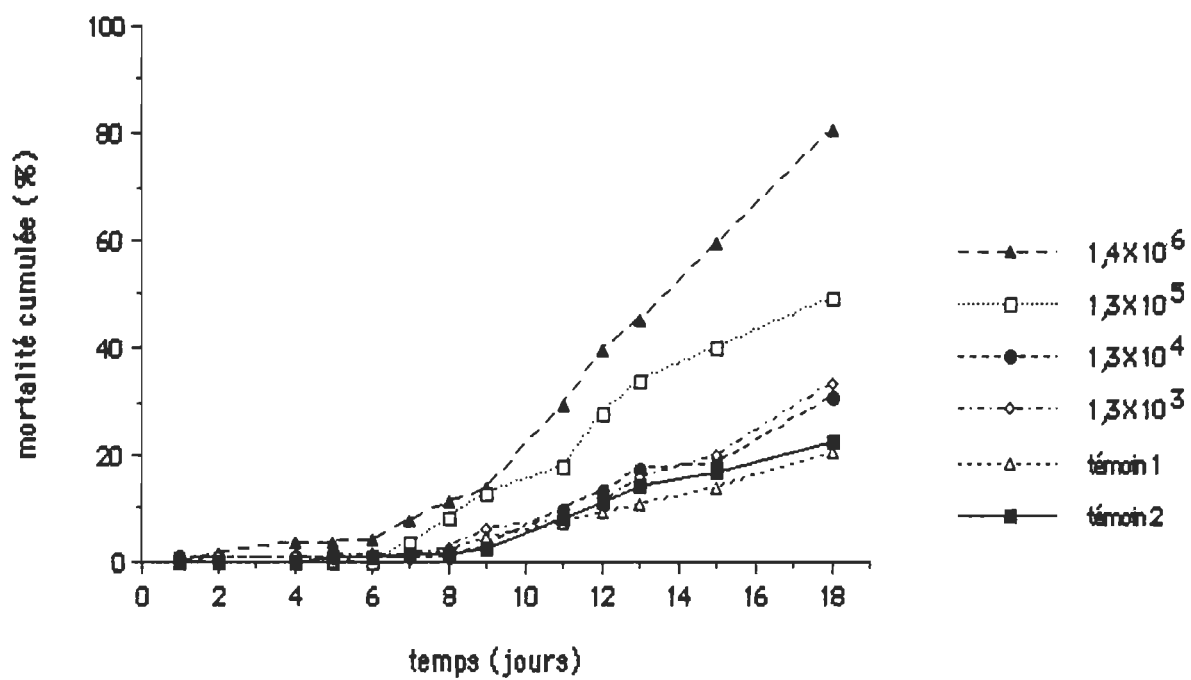
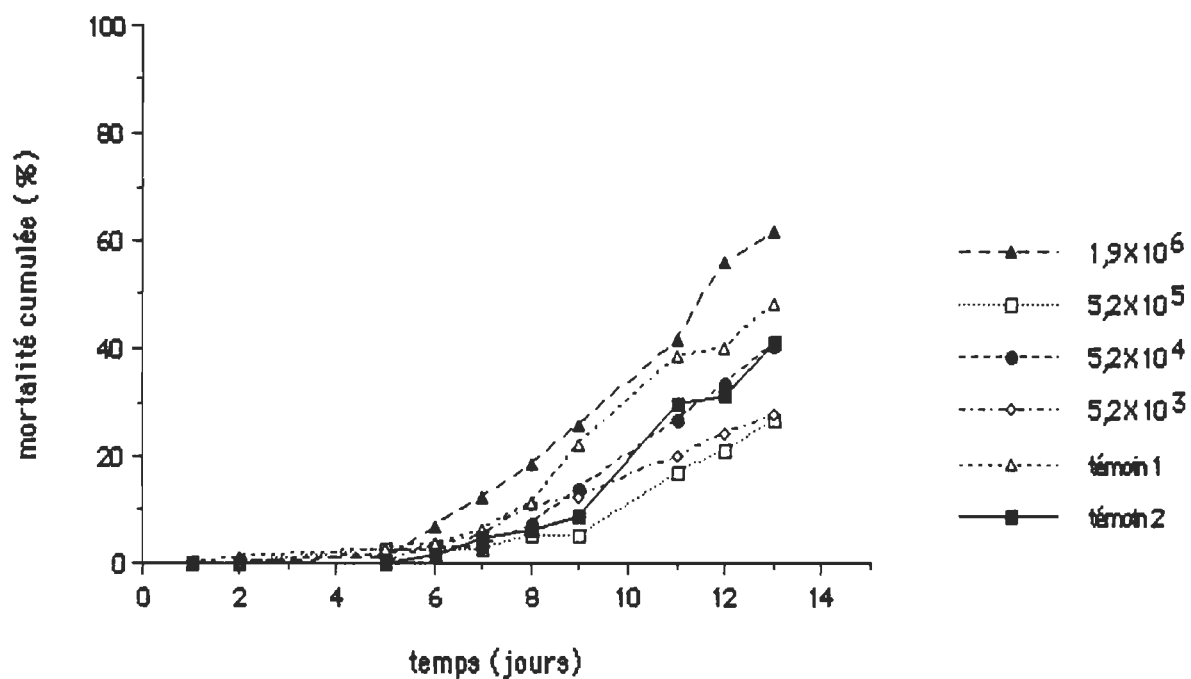


Figure 24. Mortalité des larves de Simulium corbis exposées à deux doses de blastoconidies de Tolypocladium cylindrosporum.

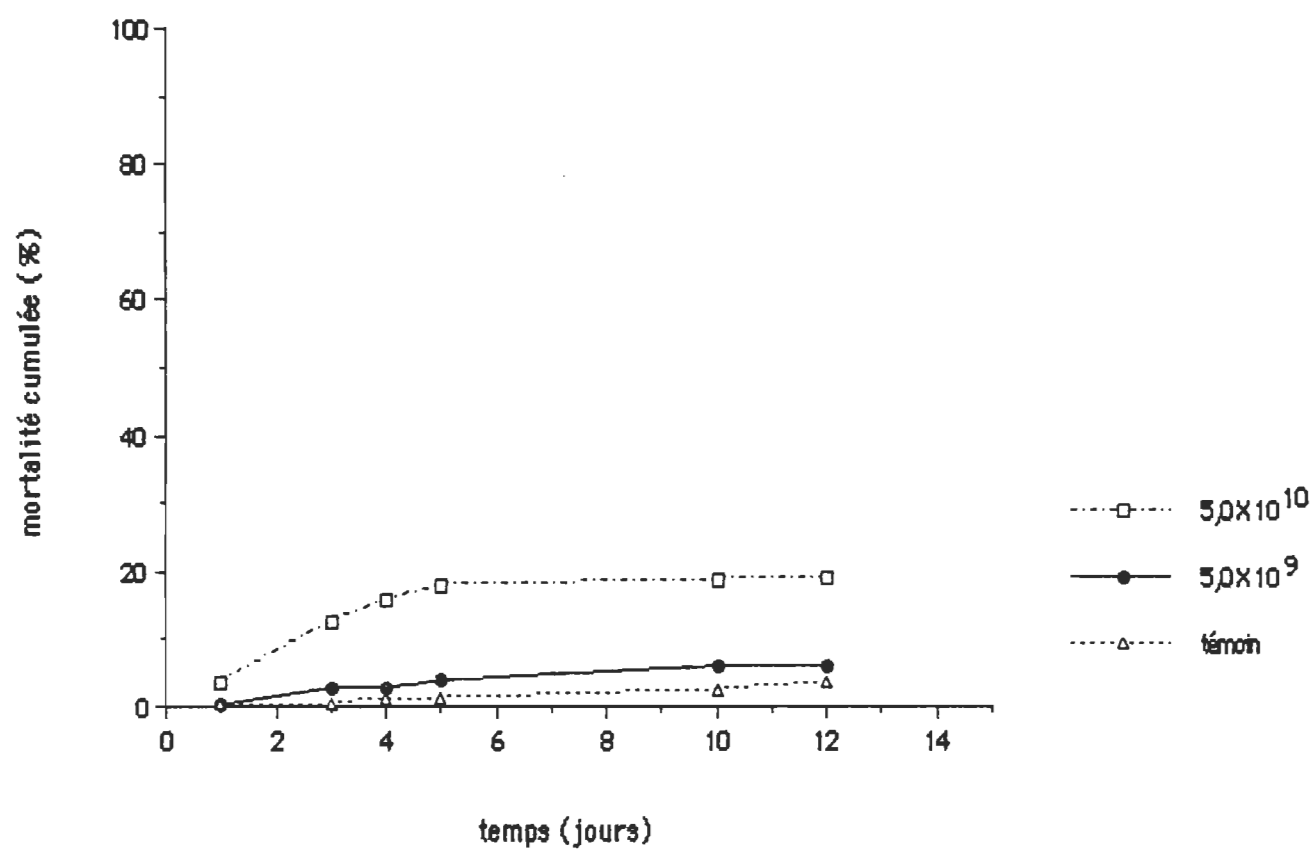


Figure 25. Mortalité des larves d'Aedes triseriatus exposées à différentes dilutions d'un filtrat de culture de 6J.

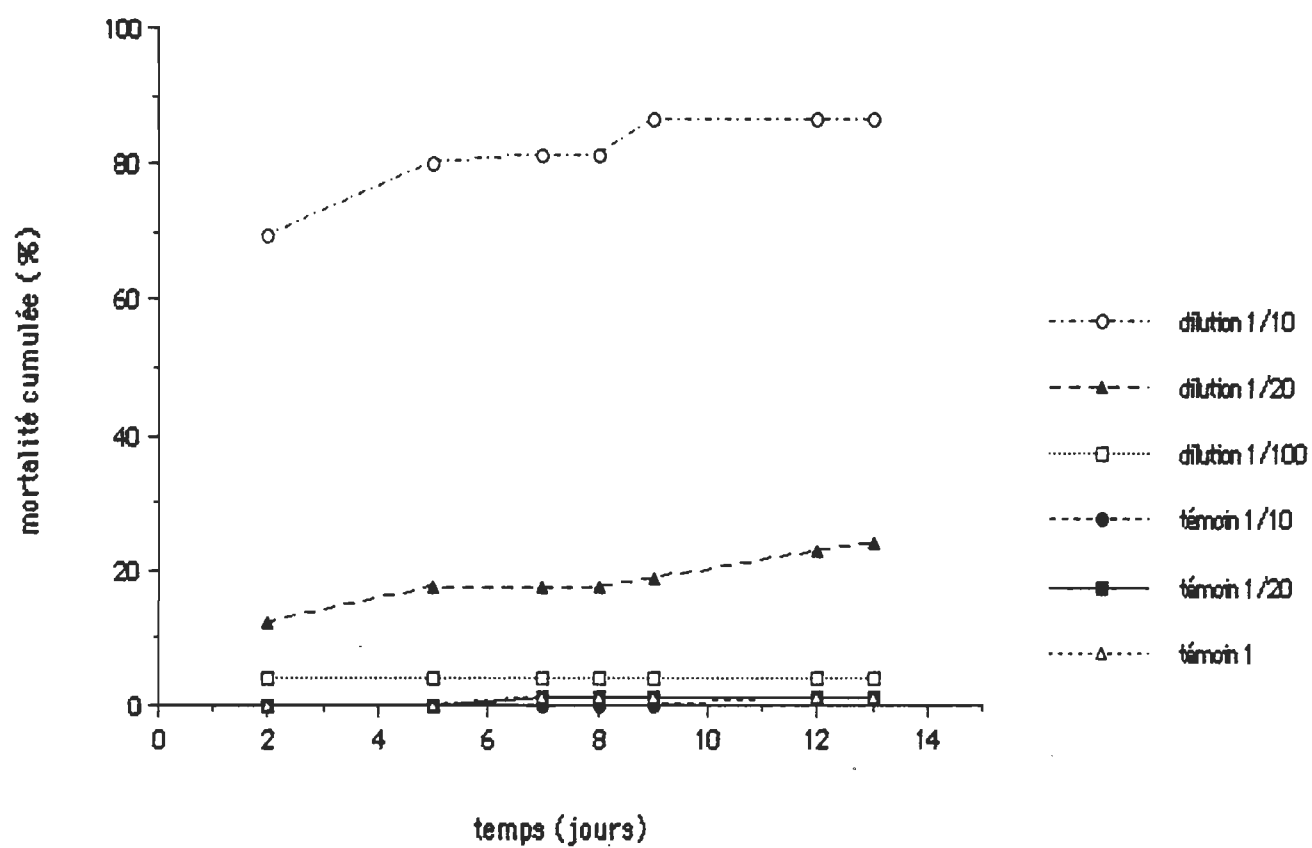


Figure 26. Carte de la Réserve faunique du St-Maurice.

- 1 ► : Décharge du lac Swasey
- 2 ► : Décharge du lac Brown
- 3 ► : Décharge du lac Eveline
- 4 ► : Décharge du lac Howe
- 5 ► : Décharge du lac Inman Est
- 6 ► : Barrage du lac Konke
- 7 ► : Ruisseau Livernois
- 8 ► : Décharge du lac Baude

Les symboles représentent les différentes dates de récolte de simuliés tués par des Entomophthorales:

- * : 20 juin 1989
- : 28 juin 1989
- : 12 juillet 1989
- ▲ : 9 août 1989

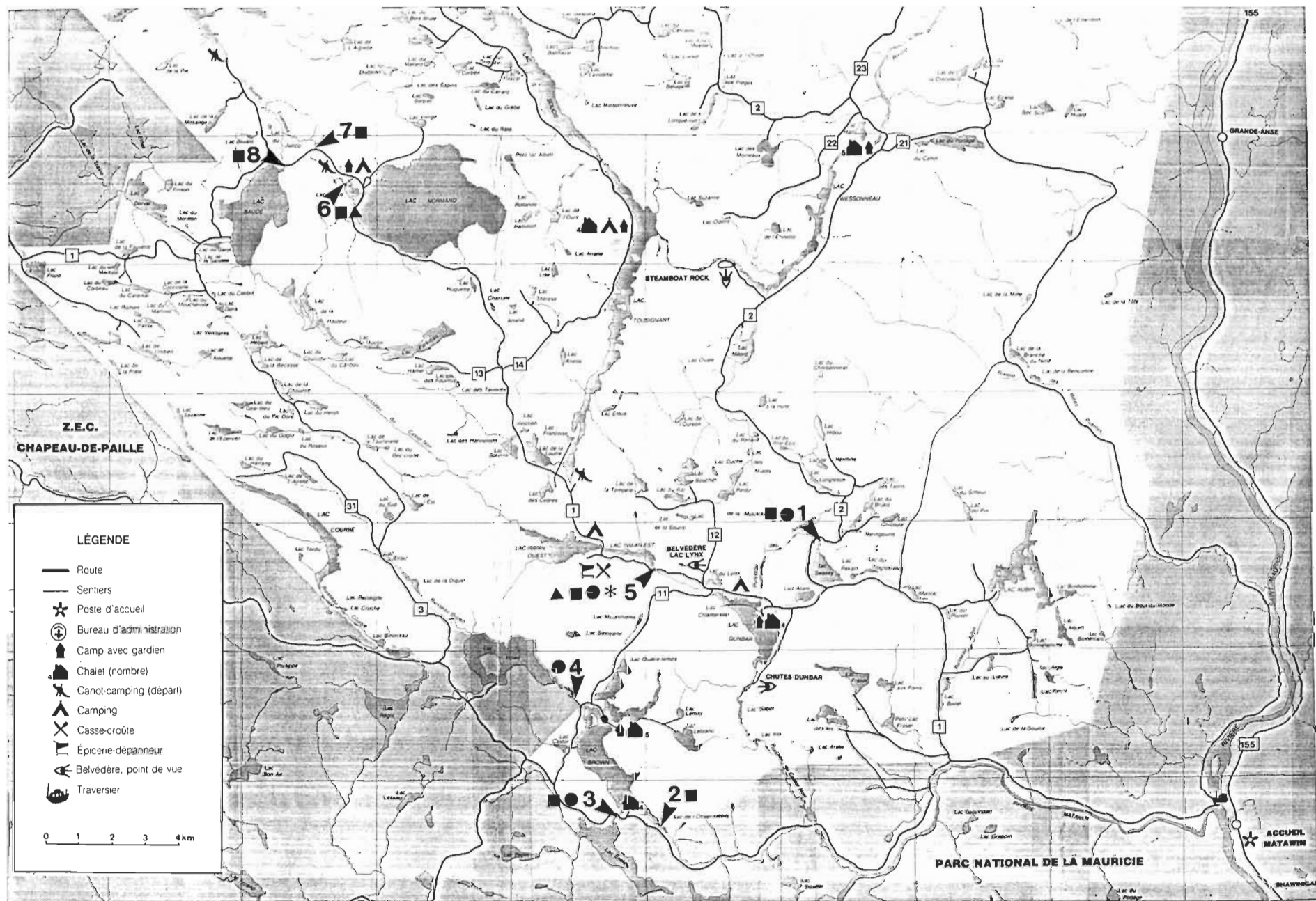


Figure 27. Trois sites de récolte de simuliés adultes atteintes d'entomophthorose.

A. Décharge du lac Inman Est (ruisseau Castor Noir)

B. Décharge du lac Eveline

C. Décharge du lac Konke

Les flèches représentent divers endroits de récolte au niveau des sites.



Figure 28. Substrats sur lesquels des simuliés adultes furent récoltés.

A. Feuille de plante aquatique (ruisseau Castor Noir)

➤: pontes de simuliés

B. Morceau de tissu (décharge du lac Eveline)

➤: pontes de simuliés -

C. Tronc d'arbre (décharge du lac Konke)

➤: simuliés infectés



Figure 29. Simulie atteinte d'entomophthorose.

1 ►: Thorax

2 ►: Aile

3 ►: Masse d'oeufs de simulies



CHAPITRE III

DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous analyserons les résultats décrits au chapitre précédent. Nous discuterons de la virulence des deux souches de C. clavisporus et de celle de T. cylindrosporum sur simuliés et sur moustiques. Une section sera consacrée aux isolats mycéliens, et finalement nous parlerons de la variabilité des essais biologiques, et des épizooties à Entomophthorales.

Les pourcentages de mortalité mentionnés dans ce chapitre proviennent des courbes de mortalité obtenues, mais corrigées avec la formule d'Abbott (1925) (annexe B).

III. 1 PATHOGÉNÉCITÉ DE CULICINOMYCES CLAVISPORUS.

Les conidies des deux souches de C. clavisporus tuent les larves d'Ae triseriatus (fig. 5 et 6). D'ailleurs, C. clavisporus est reconnu comme étant pathogène pour toutes les espèces de moustiques testées (Roberts et Panter, 1985, Sweeney, 1985). La mortalité est plus forte avec l'augmentation de la concentration des suspensions de conidies, et la concentration "limite" pour obtenir une mortalité larvaire intéressante, est de l'ordre de 10^5 - 10^6 conidies/ml. Sur les courbes de mortalité, on observe une période de latence,

et ensuite la mortalité s'échelonne sur une période de quelques jours à plus de deux semaines. Sweeney (1983) mentionne également que la mortalité peut être observée après plus d'une semaine de contact. La période de latence représente probablement le temps nécessaire à la mise en oeuvre du cycle pathologique (voir I.1.).

La souche de l'UAMH semble plus pathogène que celle de l'ATCC. En effet, aux concentrations de 10^6 - 10^5 conidies/ml, après 7 jours d'exposition, on obtient pour les deux concentrations, 94% de mortalité pour la souche UAMH, comparativement à 68 et 22% pour l'ATCC. Cooper et Sweeney (1982) n'ont pas trouvé de différence entre la pathogénécité (sur moustiques) de deux souches de C. clavisporus, en provenance de deux régions géographiques différentes, les Etats-Unis et l'Australie. Goettel (1987a), en comparant des souches australienne, américaine et canadienne, observa du dimorphisme au niveau des conidies (conidies ovales et obovées) pour toutes les souches, mais une prédominance des conidies ovales dans les souches américaine et australienne. Lors des essais biologiques avec les souches canadienne (UAMH) et américaine (ATCC), nous avons également noté un plus grand nombre de conidies ovales dans les suspensions obtenues à partir de la souche ATCC. En supposant que les conidies ovales soient moins virulentes que les conidies obovées, ceci pourrait expliquer la différence de pathogénécité entre la souche UAMH et ATCC. Il serait intéressant de trouver d'autres souches ou des mutants ne produisant qu'un type de conidies (ovales, obovées), pour vérifier si en effet, il existe une variation dans la virulence entre les deux types de conidies. Si tel

est le cas, le potentiel de C. clavisporus comme agent de contrôle serait grandement rehaussé.

D'après Sweeney (1978) et Knight (1980), plus de 95% des larves de moustiques exposées à C. clavisporus (concentration de 10^5 conidies/ml) meurent lorsqu'incubées à des températures variant de 15 à $27,5^{\circ}\text{C}$, mais la mortalité est négligeable à 30°C . Lors de nos expériences, nous obtenons également des mortalités à 20 et 25°C (fig. 7 et 8), mais nous notons, contrairement à ces auteurs, une forte baisse de la mortalité avec l'augmentation de la température pour la souche ATCC. Par exemple, après 9 jours d'exposition, la mortalité passe de 60 à 20% entre 20 et 25°C et cela, même si la concentration finale de conidies/ml est deux fois plus élevée à 25 qu'à 20°C . L'utilisation de souches mycéliennes et d'espèce cible différentes pourraient expliquer les variations entre nos valeurs et celle de Knight (1980) et Sweeney (1978).

Cependant, les souches de C. clavisporus croissent lentement et sporulent peu dans nos milieux de culture. Une fois résolu le problème de production de masse, d'autres essais biologiques pourront être réalisés sur moustiques (stades larvaires, temps de contact) et sur simulies.

III.2 PATHOGENECITE DE TOLYPOCLADIUM CYLINDROSPORUM.

On observe (fig. 9) des mortalités importantes chez les larves d' Ae triseriatus exposées aux conidies de T. cylindrosporum, surtout aux

concentrations les plus élevées; 100% à 10^6 conidies/ml et 67% à 10^5 conidies/ml après 15 jours d'exposition. Ces résultats sont comparables aux études effectuées sur d'autres espèces de moustiques par Soares (1982), Riba *et al* (1986) et Goettel (1987c).

Les larves de moustiques sont très peu résistantes aux blastoconidies (fig. 17). Plus la concentration en blastoconidies est élevée, plus la réponse est forte et rapide. Par exemple, après 4 jours d'exposition continu, on a 88% de mortalité à 10^6 blastoconidies/ml, contre 20% à 10^5 blastoconidies/ml; de plus, le temps pour obtenir 50% de mortalité est d'environ 2 jours à la concentration de 10^6 blastoconidies/ml et de 6 jours à 10^5 blastoconidies/ml. Comme l'ont confirmé la plupart des auteurs, les blastoconidies sont beaucoup plus virulentes que les conidies, sur moustiques (Soares, 1982, Soares et Pinnock, 1984, Riba *et al*, 1986). L'activité larvicide des conidies par rapport à celle des blastoconidies, prend plus de temps à se manifester, et le pourcentage de mortalité à concentration égale de conidies est inférieur. Citons en exemple, qu'après 11 jours d'exposition continue, à 10^6 et 10^5 spores/ml, et à 20^0 C, nous obtenons 99 et 76% de morts avec les suspensions de blastoconidies (fig. 17) comparativement à 41 et 39% aux mêmes concentrations pour les conidies (fig. 11). Il y a donc avantage à préconiser l'utilisation des blastoconidies au lieu des conidies comme larvicide de moustiques. La différence entre les deux types de spores serait due à la germination plus rapide des blastoconidies par rapport aux conidies (Soares et Pinnock, 1984, Riba *et al*, 1986).

Un autre facteur pourrait expliquer la forte mortalité observée en peu de temps avec les blastoconidies; soit la présence d'une toxine. Weiser et Matha (1988), font mention de la présence d'un métabolite entomotoxique pour les moustiques et les simuliés (la "tolypine") apparaissant dans des vieilles cultures gélosées de T. cylindrosporum. Il semble également qu'un ou des métabolite(s) toxique(s) pour Ae triseriatus soi(en)t présent(s) dans les bouillons de culture utilisés pour la croissance de T. cylindrosporum. De fait, des dilutions d'un filtrat de culture se sont avérées toxiques pour les larves de moustiques (fig. 20), causant des mortalités très fortes après seulement trois jours d'exposition. Lors des essais biologiques avec les blastoconidies, les spores étaient lavées deux fois avec de l'eau distillée pour enlever le milieu de culture, ce qui exclut la présence de toxines dans les suspensions de blastoconidies. Il est reconnu que certains Hyphomycètes pathogènes d'insectes tuent leur hôte après une forte croissance dans les tissus de ce dernier. D'autres Hyphomycètes vont plutôt induire la mort de l'hôte avant de proliférer dans les tissus (Ferron, 1985, McCoy et al. 1988). Dans ce deuxième cas, la mortalité serait plus rapide et attribuée à la présence d'un ou plusieurs métabolites entomotoxiques (mycotoxines), tel les dextruxines isolées du filtrat de culture de M. anisopliae, et qui sont mortelles lorsqu'additionnées dans l'eau de maintenance des larves de moustiques (Robert et al. 1986). Selon McCoy et al. (1988), les mycotoxines seraient ingérées ou absorbées au travers de la cuticule de l'insecte. Egalement Matewale et al. (1986), mentionnent que les blastoconidies de T. cylindrosporum contiennent plus de nutriments que les conidies. En supposant que la ou les toxines soi(en)t présente(s) dans les deux types de structures, mais en plus grande quantité dans les blastoconidies, et

qu'elles soi(en)t sécrétée(s) lors de la germination des spores, ceci expliquerait la mortalité plus rapide et plus forte des blastoconidies comparativement aux conidies. Des analyses ultérieures des individus morts, exposés aux blastoconidies, aux conidies et au filtrat de culture, ainsi que des travaux pour extraire et caractériser le ou les métabolite(s) entomotoxique(s) sont nécessaires pour comprendre davantage les mécanismes d'infection et/ou d'intoxication mis en cause lors de l'exposition des larves d'*Ae triseriatus* à *T. cylindrosporum*. Ces études, en plus de fournir des informations sur la pathologie, permettraient de choisir les méthodes de traitements les plus efficaces pour lutter contre les moustiques à l'aide de *T. cylindrosporum*.

De plus, lorsqu'on expose les larves de moustique à des suspensions de blastoconidies de *T. cylindrosporum* et pour des temps de contact variables, on remarque que l'augmentation de la mortalité est proportionnelle au temps de contact (fig. 18 et 19). Les larves qui sont en contact plus longtemps avec les blastoconidies, sont plus susceptibles d'être atteintes par un plus grand nombre de ces spores, que celles soumises pour un temps inférieur; cette différence dans le facteur blastoconidies/hôte/temps expliquerait les variations dans les mortalités lors des essais biologiques avec les temps de contact. De plus, pour tous les temps d'exposition, on assiste à une mortalité rapide, et ce dès les premières journées; donc il est plausible de penser que des toxines participent également au cycle pathologique. Même après seulement 15 minutes de contact, on note des résultats très intéressants; après 2 jours, on a 43% de mortalité à 10^6 blastoconidies/ml et 65% à 10^7 blastoconidies/ml, et on observe une mortalité croissante atteignant à la fin de

l'expérience, 48 et 73% pour les deux concentrations respectivement. Si les essais biologiques avaient continué quelques jours de plus, nous croyons par extrapolation, que la mortalité aurait été encore plus élevée pour chaque temps de contact. Par exemple, à 15 minutes de temps de contact, avec une suspension de 10^7 blastoconidies/ml, on peut supposer que l'on obtiendrait une mortalité au-delà de 95% après 7-8 jours.

Ces résultats sont importants, car l'utilisation de temps de contact par rapport à une exposition continue reflète un peu plus la réalité du terrain. Lors des applications d'insecticides de type particulaire, surtout en eau courante et en milieu semi-stagnant, les larves de diptères ne sont en contact avec les particules, que pendant un temps limité (voir partie I.3.8). C'est la première fois que de tels tests sont réalisés pour vérifier cet aspect chez T. cylindrosporum, et les résultats sont encourageants. T. cylindrosporum est pathogène, même si le temps de contact est très court. De plus, il est bon de noter qu'aucun effort n'a été orienté vers la formulation des blastoconidies, ce qui pourrait augmenter de façon significative l'efficacité d'un insecticide. Par exemple, on pourrait penser à encapsuler des blastoconidies, ce qui devrait permettre une plus grande ingestion de particules pathogènes, durant une courte période de temps. Si de tels travaux étaient entrepris, il est possible de croire que la mortalité serait encore plus importante.

Tolypocladium cylindrosporum est pathogène pour les moustiques aux températures de 18, 20 et 25° C (fig. 10, 11 et 12). Egalement, nous n'observons pas de différence marquée de l'activité larvicide des conidies de T.

cylindrosporum, ni dans les concentrations, ni dans les temps létaux, et ce aux trois températures. Certains auteurs mentionnent, lors d'essais biologiques sur d'autres espèces de moustiques, que T. cylindrosporum est pathogène aux températures se situant entre 12 et 30° C (Soares et al. 1984, Riba et al. 1986, Goettel, 1987c). La température ne semble donc pas être un facteur environnemental limitatif pour l'utilisation de T. cylindrosporum, dans les conditions climatiques canadiennes. Comme les blastoconidies sont plus virulentes que les conidies, et donc favorisées pour les traitements antimoustiques, il faudrait voir, au moyen d'essais biologiques, si elles conservent leur pouvoir larvicide à des températures inférieures à 20° C.

La réponse des différents stades larvaires aux conidies de T. cylindrosporum n'a pas été très étudiée. Selon Riba et al. (1986), les larves de 2^{ème} stade seraient légèrement plus résistantes que celles de 4^{ème} stade. Dans notre étude, tous les stades larvaires sont sensibles aux conidies de T. cylindrosporum, et principalement à la concentration de 10⁷ conidies/ml (fig. 13, 14, 15 et 16). A cette concentration, après 11 jours d'exposition continue, on a 55, 50, 63 et 92% de mortalité pour les quatre stades larvaires respectifs. Si on exclut le 4^{ème} stade, où la concentration en conidies est quatre fois plus élevée que les autres concentrations, il n'y a pas de différence importante entre les stades larvaires. Du point de vue pratique cette observation est intéressante, car pour la majorité des larvicides chimiques et biologiques, il existe une forte corrélation entre le stade larvaire et la "dose efficace" sur le terrain. T. cylindrosporum pourrait avoir un avantage en ce sens, qu'une dose unique serait utilisée peu importe le stade larvaire au moment du traitement.

Cependant, on note que la mortalité s'élève plus rapidement pour les 1^{er} stade. En effet, après 7 jours d'exposition à 10^7 conidies/ml, on obtient des mortalités de 67, 24, et 19% pour les 1^{er}, 2^{ième} et 3^{ième} stades larvaires. A cette période, la mortalité s'élève à 44% pour le 4^{ième} stade, mais la concentration en conidies est quatre fois plus élevée que lors des essais avec les autres stades larvaires. Ce qui suppose qu'avec une concentration équivalente pour les quatre stades larvaires, la virulence des conidies de T. cylindrosporum diminuerait légèrement avec l'augmentation du stade larvaire.

Cette variation dans la virulence pourrait s'expliquer par le comportement alimentaire des larves d'Ae triseriatus. Selon Merritt et al (1978), les larves d'Ae triseriatus ingèrent des particules inférieures à 50 µm. De plus la grosseur des particules ingérées augmente avec l'âge larvaire; les larves de 1^{er} et de 2^{ième} stade préfèrent des particules inférieures à 2 µm, celles du 3^{ième} inférieures à 50 µm (majorité entre 2-10 µm), et celles du 4^{ième}, aussi inférieures à 50 µm (majorité entre 10-25 µm) (Merritt, 1987). Egalement, nous avons mentionné qu'en milieu naturel, les larves d'Ae triseriatus, non seulement filtrent les particules en suspension dans la colonne d'eau, mais broient ou broutent la microflore (détritrus, bactéries, mycètes) (Fish & Carpenter, 1982). Enfin Goettel (1988b) ajoute que les conidies de T. cylindrosporum peuvent être ingérées par les larves de moustiques et excrétées sans être atténuées. Comme les conidies de T. cylindrosporum mesurent entre 3,5-6,8 X 1,2-1,9 µm, elles seront ingérées intactes (par filtration), surtout par les 3^{ième} et 4^{ième} stade larvaire, celles de 1^{er} et de 2^{ième}

vont plutôt brouter les conidies. En supposant que les conidies contiennent une ou des toxine(s) létale(s) pour les larves, elle(s) serai(en)t relâchée(s) dans le milieu par les broyeurs, causant une mortalité qui s'additionnerait à celle causée par la pénétration des conidies dans le corps de l'insecte. Tandis que chez les filtreurs (3^e et 4^{ème} stade), les conidies peuvent être ingérées et excrétées intacts, la toxine ne quittant pas la spore, ou encore, la conidie peut être hydrolysée dans le tube digestif et la ou les toxine(s) inhibée(s) par les enzymes et le pH alcalin. La différence entre le 1^{er} et le 2^{ème} stade pourrait s'expliquer par une activité alimentaire qui diminuerait avec l'augmentation du stade larvaire. Finalement, peut-être qu'une partie des résultats s'explique par une augmentation de la résistance physiologique à *T. cylindrosporum* avec l'augmentation du stade larvaire.

Les résultats obtenus avec ces temps de contact courts impliquent entre autre, la possibilité de faire des applications sur le terrain contre les simuliés, d'autant plus que *T. cylindrosporum* s'est révélé pathogène en laboratoire pour les larves de *S. vittatum* (fig. 21). C'est la première fois que des tests sont réalisés sur les simuliés avec *T. cylindrosporum*. Comme lors des essais biologiques sur moustiques, les mortalités sont principalement observées à forte concentration (10^6 conidies/ml), et pour les deux types de spores (conidies et blastoconidies). On constate (fig. 22 et 23) que les temps de latence (période entre le début de l'essai biologique et le début des mortalités) sont plus longs, et les mortalités sont plus faibles que lors des essais avec les moustiques (fig. 17 et 23). Cette différence dans la virulence, peut s'expliquer entre autre par la température d'exposition des espèces cibles lors des essais

biologiques, qui était de 10^0 C pour S. vittatum par rapport à 20^0 C pour Ae triseriatus. Soares et Pinnock (1984) observent une forte diminution du pourcentage de germination des conidies et des blastoconidies après 24 heures, lorsque la température passe de 20 à 10^0 C. Cette diminution de la germination à 10^0 C, pourrait provoquer une chute de la viabilité des spores, entraînant ainsi une baisse de la mortalité lors des essais biologiques. Egalement, il se peut que la germination soit ralentie à basse température, ce qui engendrerait un ralentissement du cycle pathologique; les larves meurent moins rapidement, et donc le temps de latence s'allonge.

Lors de tests sur le terrain avec le système de gouttières (fig. 24), on enregistre près de 20% de morts à la dose de 5×10^{10} blastoconidies.L⁻¹.sec., et ce 5 jours après un contact de seulement 30 min. Cette rapidité par rapport aux résultats en laboratoire est probablement due à la température plus élevée sur le terrain, et au fait que le système de gouttières soit plus naturel que les béciers, comme en fait foi la mortalité dans les témoins après 12 jours (3%).

Cette mortalité de 20% est intéressante, car il est important de signaler, que sur le terrain les larves sont dans un courant d'eau continu pendant 30 minutes; l'exposition se fait donc dans un volume d'eau beaucoup plus grand qu'en laboratoire, où le volume est constant à 300 ml. Pour ramener cette dose de terrain en concentration utilisée en laboratoire (blastoconidies/ml), on détermine le volume d'eau total en multipliant le débit

d'eau dans la gouttière par le temps de contact: $0,19 \text{ L/sec} \times 30 \text{ min.} \times 60 \text{ sec/min.} = 342 \text{ L.}$

Ce volume de 342 litres (ou $342 \times 10^3 \text{ ml}$) correspond en fait, au volume d'exposition auquel on a ajouté un total de $9,5 \times 10^9$ blastoconidies. Par comparaison avec le système du laboratoire, on obtient: $9,5 \times 10^9$ blastoconidies/ $342 \times 10^3 \text{ ml} = 2,8 \times 10^4$ blastoconidies/ml.

Si on compare cette concentration avec les résultats obtenus en laboratoire (fig. 23), on constate qu'à la concentration de 10^4 blastoconidies/ml nous avons obtenu très peu de mortalité, la courbe suit pratiquement celle des témoins. Or, sur le terrain (fig. 24), on note une différence significative entre la dose de 5×10^{10} blastoconidies. $\text{L}^{-1}.\text{sec.}$ équivalente à 10^4 blastoconidies/ml en laboratoire, et le témoin. Egalement, on s'aperçoit que la mortalité se manifeste plus rapidement sur le terrain que lors des essais en laboratoire. Donc, même à une concentration de l'ordre de 10^4 blastoconidies/ml, nous obtenons dans le système de gouttières des résultats très intéressants. Au laboratoire, avec les blastoconidies, pour obtenir des mortalités qui se démarquent de celles des témoins, il faut soumettre les larves à des concentrations de $10^6/\text{ml}$ (fig. 23). Comme les résultats, à concentrations équivalentes sont supérieurs dans le système de gouttières à ceux du laboratoire, nous croyons qu'il en serait ainsi pour les concentrations plus fortes, et que des mortalités importantes seraient obtenues avec des doses de terrain correspondant à des concentrations de 10^6 et peut-être 10^5 en laboratoire, considérant l'augmentation de température sur le terrain. Un

autre facteur non-négligeable est celui de la taille des larves lors des essais sur le terrain. En plus de réaliser des essais avec des doses plus élevées, on pourrait également refaire des tests avec des larves de 1^{er}-2^{ème} stade, et probablement que les résultats seraient de beaucoup supérieurs à ceux obtenus ci-haut. Ces essais biologiques sont réalisables, car T. cylindrosporum sporule très bien sur et dans les milieux synthétiques. Nous obtenons sur les géloses Pabulum de 15 cm de diamètre, des concentrations de l'ordre de 10^8 - 10^9 conidies/ml, et dans les bouillons Sabouraud-Dextrose, la production de spores après cinq jours, s'élève à 10^7 - 10^8 blastoconidies/ml. De plus, il serait intéressant d'évaluer les filtrats de culture de T. cylindrosporum contre les larves de simulies, pour vérifier si leur toxicité face aux moustiques s'étend également aux simulies.

III. 3 PATHOGENECITE DES SOUCHES ISOLEES D'OEUF, DE LARVES ET D'ADULTES DE SIMULIES.

Plusieurs souches mycéliennes ont été isolées et la plupart, sauf 6J, B et 44, n'ont pas donné de résultats intéressants en laboratoire, indiquant fort probablement leur nature saprophytique, tel les individus du genre Saprolegnia, dont une espèce Saprolegnia diclina a été isolée de larves de simulies. De plus, des souches de S. diclina parasitent également certaines espèces de poissons, ce qui restreint donc son utilisation éventuelle comme larvicide de Culicidae et de Simuliidae (Jong & Gantt, 1987). Cependant, il est possible que les passages répétés sur milieux synthétiques aient causé une perte du pouvoir pathogène des souches isolées. Il serait important lors de la

poursuite des travaux, de voir à maintenir les souches par passage sur des individus sains, et ce de façon parallèle à l'isolation de manière conventionnelle.

Les espèces Fusarium avenaceum, Fusarium moniliforme, Fusarium oxysporum, et les genres Ascochyta, Phoma, Mortierella et Acremonium, sont généralement des parasites de plantes (Booth, 1971, Hawksworth et al. 1983, Johnson & Booth, 1983, Jong & Gantt, 1987). Il se peut donc que leur présence sur des oeufs, larves et adultes de simulies soit accidentelle. On sait que les adultes de simulies pondent sur des plantes aquatiques, et que certaines larves restent accrochées à cette même végétation, après l'éclosion de l'oeuf. Il est plausible de croire que les adultes aient pondu sur des plantes parasitées par les mycètes isolés, et que les spores mycéliennes se soient retrouvées accidentellement sur l'adulte, l'oeuf ou la larve. Il se peut également que certains de ces isolats ne soient que des parasites secondaires d'insectes, et qu'une fois l'organisme infecté placé sur les milieux de culture synthétique, ils inhibent la croissance du mycète responsable de la mort. C'est ce qui est arrivée avec les individus atteints d'entomophthoroses à l'été 1988; les Entomophthorales ont été inhibées sur les milieux de culture, et d'autres souches mycéliennes se sont développées. D'où l'importance de reconnaître le type de mycose, et d'utiliser les techniques adéquates pour l'isolation et la mise en culture. Par exemple, en plus de prélever des filaments mycéliens se trouvant à la surface de la cuticule, on aurait pu disséquer les individus, et placer sur les milieux de culture, des structures mycéliennes différentes de celles observées en surface. Egalement, lorsque le nombre de spécimens morts

de mycoses le permettent, on devrait placer certains individus avec d'autres individus sains, en provenance d'un élevage, et isoler ensuite le mycète à partir de ces derniers individus, comme l'ont démontré Brey et Remaudière (1985), dans l'isolation de L. giganteum s'attaquant à des larves de moustiques.

La sélection des souches 6J, B, et 44 a été basée sur des résultats préliminaires, où les mortalités obtenues avaient été élevées et très significatives par rapport aux témoins. Cependant, lors des essais en triplicata, et par conséquent quelques passages plus tard, les résultats ont indiqué une forte baisse dans la mortalité. Or, comme les conditions de culture étaient essentiellement identiques, il y a lieu de croire que ce sont les passages répétés qui ont causé cette perte de pathogénécité.

Parmi les souches intéressantes, nous en avons deux du genre Acremonium. Ce genre que l'on retrouve dans les milieux terrestres et/ou aquatiques est généralement reconnu comme producteur d'antibiotiques (céphalosporines) (Jong & Gantt, 1987), et peut-être bien d'autres molécules toxiques (alcaloïdes, K. Mickerson, comm. pers.). Effectivement, les filtrats des souches B et 6J ont démontré une certaine activité toxique. Cependant, seul le filtrat de culture de la souche 6J a donné des résultats encourageants contre les larves de moustiques (fig. 25). Par contre, nous avons noté une diminution de la pathogénécité lors d'un essai biologique subséquent. Il se peut que la souche ait perdu la capacité de produire le ou les métabolite(s) toxique(s) suite aux repiquages sur nos milieux synthétiques, ou encore, que la différence dans

les temps de culture du mycète (27 jours pour le premier essai et 22 jours pour le second) ait influencé la production de toxines de façon substantielle, causant ainsi une diminution de la mortalité.

III. 4 VARIABILITE DES ESSAIS BIOLOGIQUES.

Des variations dans les mortalités, entre les essais et au niveau d'un même essai, ont été observées lors de l'exposition des larves d'Ae triseriatus à C. clavisporus et T. cylindrosporum. Par exemple , il arrive que la mortalité enregistrée à une concentration donnée, soit inférieure à celle d' une concentration moindre (fig. 9 et 10), ou que certaines courbes de mortalité varient d'un essai à un autre, comme celles de la concentration de 10^6 blastoconidies/ml en exposition continue aux figures 17 et 18. Certaines de nos observations peuvent expliquer ces variations. Nous avons remarqué que les conidies et les blastoconidies germent et sporulent dans les contenants à essai biologique. Ceci aurait donc pour effet d'augmenter la concentration de l'inoculum. Egalement, dans certains contenants, on assiste au développement d'une flore bactérienne, ce qui augmente la turbidité du milieu. Cette présence de populations bactériennes est observée, surtout lorsque les essais biologiques sont prolongés. Goettel (1987c) fait également les mêmes observations, et suppose que la flore bactérienne pourrait avoir un rôle sur la viabilité des conidies. De plus, Goettel (1988b) ajoute que les conidies de T. cylindrosporum qui ne sont pas digérées, sont toujours viables lorsque excrétées. Sweeney (1983) mentionne aussi que les différents lots de conidies et de larves seraient des sources de variations.

Une bonne partie de ces sources de variation pourraient être diminuées ou éliminées, en utilisant des temps de contact plus courts au lieu d'une exposition continue des larves lors des essais biologiques, comme ceux avec les blastoconidies de T. cylindrosporum (fig. 18 et 19).

III. 5 EPIZOOTIE A ENTOMOPHTHORALES.

Dans la littérature, on trouve seulement trois cas d'entomophthoroses de simulies en Amérique du Nord; Thaxter (1888) découvre Simulium molestus (= S. venustum Say) parasité par Entomophthora culicis (Braun) Fresenius (Etats-Unis); Shemanchuk et Humber (1978), font également mention d'E. culicis parasitant cette fois S. venustum et S. vittatum en Alberta (Canada); et plus récemment, Kramer (1983) trouve des Simulium decorum Walker infectées par Erynia curvispora (Etats-Unis). C'est donc la première fois en Amérique du Nord, que l'on fait mention d'Erynia conica et d'un Conidiobolus s'attaquant aux diptères Simuliidae.

Comme nous, Shemanchuk & Humber (1978) ainsi que Kramer (1983) n'ont trouvé que des simulies adultes infectées, et à des endroits offrant une forte humidité. Possiblement que cette humidité est nécessaire au développement du mycète, mais également, ces endroits sont bien souvent des sites de pontes des simulies. Il se peut donc que les femelles soient infectées lors de la ponte, d'autant plus que l'ensemble des individus disséqués à ce jour sont des femelles, et ont été trouvées pour la plupart sur des pontes de

simulies. Hywell-Jones & Ladle (1986) mentionnent que les simulies adultes infectées par E. conica retournent au site de ponte en même temps que les individus sains, mais que les individus infectés semblent incapables de pondre leurs oeufs. De plus des simulies saines ont été observées avec des conidies d'E. conica sur leurs ailes, après la ponte. Egalement, certaines espèces d'Entomophthorales, dont E. conica, produisent des structures aquatiques (Webster et al, 1978, Descals et al, 1981). Descals et al (1981) suggèrent que les stades immatures des simulies pourraient être des cibles de ces structures aquatiques.

Nous avons également trouvé des infections doubles à Entomophthorales chez certains individus, impliquant un Conidiobolus sp. et une Erynia sp. Il est possible de croire qu'une des deux espèces soit un saprophyte, et qu'elle se soit attaquée secondairement à la simule, suite à son décès, provoquée par l'autre espèce d'Entomophthorale. Donc, à partir des isolats obtenus, des études au laboratoire sont souhaitables pour obtenir les différentes structures aquatiques et aériennes, et évaluer par des essais biologiques sur des larves et adultes de simulies, le pouvoir pathogène des différentes structures obtenues. Ces travaux permettront de comprendre le cycle pathologique des différentes souches isolées. Des dissections ultérieures des individus conservés dans l'alcool, ainsi que l'analyse des lames sur lesquelles ont sporulé les mycètes en provenance des différents sites, nous permettra de mieux caractériser les souches par l'identification et la mesure des structures associées (cystides, rhizoïdes, conidiophores, spores durables), et de déterminer l'incidence des trois espèces obtenues.

Il y a des avantages très intéressants à promouvoir l'étude de ces Entomophthorales, dans le but de contrôler les populations de simulies. Premièrement, elles sont présentes dans les populations de simulies durant la saison entière. En effet, des simulies tuées par des Entomophthorales ont été récoltées du début de juin jusqu'à la fin d'août en 1989. Deuxièmement, à chaque date d'échantillonnage, on a obtenu des sporées à partir d'individus recouverts de conidiophores et placés en chambre humide, ce qui suppose que les souches d'Entomophthorales sont actives durant la saison entière de présence de simulies adultes. Troisièmement, elles sont capables d'induire des épizooties naturelles à différents sites, et ce sur des distances impressionnantes, et le nombre d'individus atteints/site augmente avec la population d'hôtes. Nous avons observé que la plus forte épizootie se situait le 12 juillet, soit à une date correspondant à la période durant laquelle les populations de simulies sont à leurs niveaux les plus élevés. Quatrièmement, ces Entomophthorales survivent aux conditions défavorables; pendant deux années consécutives des entomophthoroses ont été observées à la Réserve du St-Maurice. Ce qui suppose, qu'elles réussissent à passer au travers les quatre saisons et surtout de l'hiver rigoureux régnant à la Réserve. Par exemple, les températures peuvent passer de 30⁰ C en été à -40⁰ C en hiver. Cinquièmement, les Entomophthorales se cultivent sur des milieux synthétiques, et sixièmement, elles peuvent servir de modèle pour évaluer à long terme, l'incidence de mycètes entomopathogènes sur une population d'insectes. Ce qui implique, en plus des travaux de laboratoire sur le cycle infectieux, des études sur le terrain pour suivre les fluctuations de ces mycètes

dans les populations de simulies, et étudier les paramètres physico-chimiques afin d'élucider l'écologie de ces Entomophthorales.

REFERENCES

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 78: 1179-1181.
- Andreadis, T. G., 1988. A survey of mosquitoes breeding in used tire stockpiles in Connecticut. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 4: 256-260.
- Bissett, J., 1983. Notes on Tolypocladium and related genera. *Can. J. Bot.*, 61: 1311-1329.
- Booth, C., 1971. The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England.
- Brey, P. T. & Remaudière, G., 1985. Recognition and isolation of Lagenidium giganteum Couch. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, 10: 90-97.
- Brown, A. W. A., 1983. Insecticide resistance as a factor in the integrated control of Culicidae. In M. Laird & J. W. Miles (Eds.), *Integrated mosquito control methodologies*. Academic Press, New-York, pp. 161-235.

- Brown, A. W. A. & Pal, R., 1973. Résistances des arthropodes aux insecticides. Organisation Mondiale de la Santé, no. 38, Genève.
- Brown, B. J. & Platzer, E. G., 1977. The effects of temperature on the infectivity of Romanomermis culicivorax. J. Nematology, 9:166-172.
- Clark, T. B., 1985. Tetrahymena and Lambornella (Protozoa). In H. C. Chapman (Ed.), Biological control of mosquitoes. American Mosquito Control Association, Bull. 6, Fresno, California, pp. 59-61.
- Cooper, R. D., Hornitzky, M. & Metcraft, B. E., 1984. Non-susceptibility of Apis mellifera to Culicinomyces clavissporus. J. Aust. Entomol. Soc., 23: 173-174.
- Cooper, R. D. & Sweeney, A. W., 1986. Laboratory studies on the recycling potential of the mosquito pathogenic fungus Culicinomyces clavissporus. J. Invertebr. Pathol., 48: 152-158.
- Cooper, R. D. & Sweeney, A. W., 1982. The comparative activity of the Australian and United-States strains of Culicinomyces clavissporus bioassayed in mosquito larvae of three different genera. J. Invertebr. Pathol., 40: 383-387.

- Couch, J. N., Romney, S. V. & Balakrishna, B., 1974. A new fungus which attacks mosquitoes and related Diptera. *Mycologia*, 66: 374-379.
- Curran, J., 1982. Infectivity and development of a blackfly (Simuliidae) mermithid in mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 401-402.
- Daoust, R. A., 1983a. Non-microsporidan protozoan pathogens of Culicidae (mosquitoes). In D. W. Roberts, R. A. Daoust & S. P. Wraigt (Eds.), *Bibliography on pathogens of medically important arthropods: 1981*. World Health Organisation, VBC/ 83.1, Geneva, pp. 92-101.
- Daoust, R. A., 1983b. Fungal pathogens, except Coelomomyces, of Culicidae (mosquitoes). In D. W. Roberts, R. A. Daoust & S. P. Wraigt (Eds.), *Bibliography on pathogens of medically important arthropods: 1981*. World Health Organisation, VBC/ 83.1, Geneva, pp. 119-136.
- Daoust, R. A., 1983c. Nematode pathogens of Culicidae (mosquitoes). In D. W. Roberts, R. A. Daoust & S. P. Wraigt (Eds.), *Bibliography on pathogens of medically important arthropods: 1981*. World Health Organisation, VBC/ 83.1, Geneva, pp. 137-172.
- De Barjac, H., 1987. Operational bacterial insecticides and their potential for future improvement. In K. Maramorosch (Ed.), *Biotechnology*

in invertebrate pathology and cell culture. Academic Press, New-York, pp. 63-73.

Descals, E. & Webster, J., 1981. Variations in asexual reproduction in species of Entomophthora on aquatic insects. Trans. Br. Mycol. Soc., 77: 85-102.

Dodge, H. R., 1966. Studies on mosquito larvae. II. The first-stage larvae of North American Culicidae and of world Anophelinae. Can. Entomol., 98: 337-393.

Dubitskii, A. M., 1985. The biological regulation of Culicidae in the Soviet Union. In M. Laird & J. Miles (Eds.), Integrated mosquito control methodologies. Academic Press, San Diego, pp. 323-360.

Egerton, J. R., Hartley, W. S., Mulley, R. C. & Sweeney, A. W., 1978. Susceptibility of laboratory and farm animals and two species of duck to the mosquito fungus Culicinomyces sp. Mosq. News, 38: 260-263.

Fargues, J. & Remaudière, G., 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. Mycopathologia, 62: 31.

- Federici, B. A., 1985. Viral pathogens. In H. C. Chapman (Ed.), Biological control of mosquitoes. American Mosquito Control Association, Bull. 6, Fresno, California, pp. 62-74.
- Ferron, P., 1985. Fungal control. In G.A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Vol. 12: Insect control. Plenum Press, Oxford, pp. 313-346.
- Fest, C. & Schmidt, K. J., 1973. The chemistry of organophosphorus pesticides. Springer-Verlag, New-York.
- Fish, D. & Carpenter, S. R., 1982. Leaf litter and larval mosquito dynamics in tree-hole ecosystems. *Ecology*, 63: 283-288.
- Flint, M. L. & Van den Bosch, R., 1981. Introduction to integrated pest management. Plenum press, New-York.
- Frances, S. P., Lee, D. J., Russell, R. C. & Panter, C., 1985a. Seasonal occurrence of the mosquito pathogenic fungus Culicinomyces clavisporus in a natural habitat. *J. Aust. Entomol. Soc.*, 24: 241-246.

- Frances, S. P., Russell, R. C. & Panter, C., 1984. Persistence of the mosquito pathogenic fungus Culicinomyces in artificial aquatic environments. Mosq. News, 44: 321-324.
- Frances, S. P., Russell, R. C. & Panter, C., 1985b. Persistence of the mosquito pathogenic fungus Culicinomyces clavisporus in a natural environment. Gen. Appl. Ent., 171: 47-52.
- Fukuda, T., 1985. Helicosporidium (Protozoa). In H. C. Chapman (Ed.), Biological control of mosquitoes. American Mosquito Control Association, Bull. 6, Fresno, California, pp. 59-61.
- Gardner, J. M., 1984. Mosquito larvicidal potential of the New Zealand strain of Tolypocladium cylindrosporum. M. Sc. Diss. Univ. Otago, Dunedin.
- Gardner, J. M. & Pillai, J. S., 1986. Tolypocladium cylindrosporum (Deuteromycotina: Moniliales), a fungal pathogen of the mosquito Aedes australis. I. Influence of temperature, pH and salinity on the growth and sporulation of the fungus in the laboratory. Mycopathologia, 96: 87-90.
- Gardner, J. M. & Pillai, J. S., 1987. Tolypocladium cylindrosporum (Deuteromycotina: Moniliales), a fungal pathogen of the mosquito

- Aedes australis. III. Field trials against two mosquito species. *Mycopathologia*, 97: 83-88.
- Gaugler, R. & Jaronski, S., 1983. Assessment of the mosquito-pathogenic Culicinomyces clavisporus as a black fly (Diptera: Simuliidae) pathogen. *J. Med. Entomol.*, 20: 575-576.
- Georghiou, G. P. & Mellon, R. B., 1983. Pesticide resistance in time and space. In G. P. Georghiou & T. Saito (Eds.), *Pest resistance to pesticide*. Plenum Press, New-York, pp. 1-18.
- Goettel, M. S., 1984. A simple method for mass culturing entomopathogenic Hyphomycete fungi. *J. Microbiol. Methods*, 3: 15-20.
- Goettel, M. S. 1987a. Studies on microbial control of mosquitoes in Central Alberta with emphasis on the Hyphomycete Tolypocladium cylindrosporum. Thesis of Doctor of Philosophy., Edmonton, Alberta.
- Goettel, M. S., 1987b. Field incidence of mosquito pathogens and parasites in Central Alberta. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3: 231-238.
- Goettel, M. S., 1987c. Studies of bioassay of the entomopathogenic Hyphomycete fungus Tolypocladium cylindrosporum in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3: 561-567.

- Goettel, M. S., 1988a. Pathogenesis of the Hyphomycete Tolypocladium cylindrosporum in the mosquito Aedes aegypti. J. Invertebr. Pathol., 51: 259-274.
- Goettel, M. S., 1988b. Viability of Tolypocladium cylindrosporum (Hyphomycetes) conidia following ingestion and excretion by larval Aedes aegypti. J. Invertebr. Pathol., 51: 275-277.
- Hall, R. A. & Papierok, B., 1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitology, 84: 205-240.
- Hawksworth, D. L., Sutton, B. C. & Ainsworth, G. C., 1983. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. (7nd ed.). Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England.
- Hazard, E. I., 1985. Microsporidia (Microspora) (Protozoa). In H. C. Chapman (Ed.), Biological control of mosquitoes. American Mosquito Control Association, Bull. 6, Fresno, California, pp. 51-55.
- Holck, A. R., 1988. Current status of the use of predators, pathogens and parasites for the control of mosquitoes. Fla. Entomol., 71: 537-546.

- Hywell-Jones, N. L. & Ladle, M., 1986. Ovipositional behaviour of Simulium argyreatum and S. variegatum and its relationship to infection by the fungus Erynia conica (Entomophthoraceae). Freshwater Biol., 16: 397-403.
- Inmann III, A. O. & Bland, C. E., 1983. Fine structure of conidiogenesis in the mosquito pathogen Culicinomyces clavosporus (Deuteromycotina). Can. J. Bot., 61: 2618-2625.
- Johnston, A. & Booth, C., 1983. Plant pathologist's pocketbook. (2n ed.). Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England.
- Jong, S. C. & Gantt, M. J., 1987. Catalogue of fungi/yeasts. American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.
- Kerwin, J. L. & Washino, R. K., 1987. Ground and aerial application of the asexual stages of Lagenidium giganteum for control of mosquitoes associated with rice culture in the Central Valley of California. J. Am. Mosq. Control Assoc., 3: 59-64.
- Knight, A. L., 1980. Host range and temperature requirements of Culicinomyces clavisporus. J. Invertebr. Pathol., 36: 423-425.

- Kramer, J. P., 1983. A mycosis of the black fly Simulium decorum (Simuliidae) caused by Erynia curvispora (Entomophthoraceae). Mycopathologia, 82: 39-43.
- Lacey, L. A. & Undeen, A. H., 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. Ann. Rev. Entomol., 31: 265-296.
- Lam, T. N. C., Goettel, M. S. & Soares, G. G., 1988. Host records for the entomopathogenic Hyphomycete Tolypocladium cylindrosporum. Fla. Entomol., 71: 86-89.
- Lord, J. C. & Roberts, D. W., 1986. The effects of culture medium quality and host passage on zoosporogenesis, oosporogenesis, and infectivity of Lagenidium giganteum (Oomycetes: Lagenidiales). J. Invertebr. Pathol., 48: 355-361.
- Margalit, J. & Dean, D., 1985. The story of Bacillus thuringiensis var. israelensis (B.t.i.). J. Am. Mosq. Control Assoc., 1: 1-7.
- Matewele, P., Hall, R. A. & Burges, H. D., 1986. Effects of amino acids on sporulation and spore size of Tolypocladium cylindrosporum in submerged culture and implications for pathogenecity. In R. A. Samson, J. M. Vlak & D. Peters (Eds.), Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, p. 215.

- Merritt, R. W., 1987. Do different instars of Aedes triseriatus feed on particles of the same size? J. Am. Mosq. Control Assoc., 3: 94-96.
- Merritt, R. W., Mortland, M. M., Gersabeck, E. F. & Ross, D. H., 1978. X-ray diffraction analysis of particles ingested by filter-feeding animals. Entomol. Exp. Appl., 24: 27-34.
- McCoy, C. W., Samson, R. A. & Boucias, D. G., 1988. Entomogenous fungi. In C. M. Ignoffo (Ed.), Handbook of natural pesticides: Microbial insecticides, entomogenous protozoa and fungi (Vol. 5). CRC Press, Boca Raton, pp. 151-236.
- Molloy, D. P., 1987. The ecology of the black fly parasites. In K. C. Kim & R. W. Merritt (Eds.), Black flies, ecology, population management, and annotated world list. Pennsylvania State University, London, pp. 315-326.
- Mulla, M. S., Federici, B. A. & Darwazch, 1982. Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against stagnant water mosquitoes and its effect on nontarget organisms. Environ. Entomol., 11: 788-795.
- Mulley, R. C., Egerton, J. R., Sweeney, A. W. & Hartley, W. J., 1981. Further tests in mammals, reptiles and amphibian to delineate the host

range of the mosquito fungus Culicinomyces sp. Mosq. News, 41: 528-531.

Munstermann, L. E. & Wasmuth, L. M., 1985. Aedes triseriatus. In P. Singh & R. F. Moore (Eds.), Handbook of insect rearing (Vol. 2). Elsevier Science, Amsterdam, pp. 15-24.

Nasci, R. S., 1988. Biology of Aedes triseriatus (Diptera: Culicidae) developing in tires in Louisiana. J. Med. Entomol., 25: 402-405.

Pantuwatana, S., Thompson, W. S., Watts, D. M., Yuill, T. M. & Hanson, R. P., 1973. Isolation of LaCrosse virus from field collected Aedes triseriatus larvae. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23: 246-250.

Papierok, B., 1986. Systématique, écologie et comportement entomopathogène des Entomophthorales (Zygomycètes). Thèse de Doctorat d'Etat, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris.

Papierok, B. & Brey, P. T., 1989. A discussion of entomopathogenic fungi and their potential use for the control of insect vectors. PNUD/Banque mondiale/OMS.

Payne, C.C., 1988. Pathogens for the control of insects: Where next? Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 318: 225-240.

- Petersen, J. J., 1985. Nematodes parasites. In H. C. Chapman (Ed.), Biological control of mosquitoes. American Mosquito Control Association, Bull. 6, Fresno, California, pp. 110-122.
- Poprawski, T. J., Robert, P.-H., Majchrowicz, I. & Boivin, G., 1985. Susceptibility of Delia antiqua (Diptera: Anthomyiidae) to eleven isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. Environ. Entomol., 14: 557-561.
- Ravallec, M., Vey, A. & Riba, G., 1989. Infection of Aedes albopictus by Tolypocladium cylindrosporum. J. Invertebr. Pathol., 53: 7-11.
- Riba, G., Keita, A., Soares, G. G. & Ferron, P., 1986. Comparative studies of Metarhizium anisopliae and Tolypocladium cylindrosporum as pathogens of mosquito larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc., 2: 469-473.
- Robert, P., Riba, G., Fargues, J. & Vincent, J. J., 1986. Comparative susceptibility of mosquitoes larvae to purified dextruxines of Metarhizium anisopliae. In R. A. Samson, M. Vlak & D. Peters (Eds.), Fundamental and applied aspects of invertebrate Pathology. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, p. 258.

- Roberts, D. W. & Humber, R. A. , 1981. Entomogenous fungi. In G. T. Cole & B. Kendrick (Eds.), Biology of conidial fungi (Vol. 1). Academic Press, New-York, pp. 201-236.
- Roberts, D. W. & Panter, C., 1985. Fungi other than Coelomomyces and Lagenidium. In H. C. Chapman (Ed.), Biological control of mosquitoes. American Mosquito Control Association, Bull. 6, Fresno, California.
- Rodhain, F. & Perez, C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine, Paris.
- Samson, R. A. & Soares, G. G., 1984. Entomopathogenic species of the Hyphomycete genus Tolypocladium. J. Invertebr. Pathol., 43: 133-139.
- Saunders, G. A., Washburn, J. O., Egarter, D. A. & Anderson, J. R., 1988. Pathogenicity of fungi isolated from field-collected larvae of western treehole, Aedes sierrensis (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol., 52: 360-363.
- Savignac, R. & Maire, A., 1981. A simple character for recognizing second and third instar larvae of five canadian mosquito genera (Diptera: Culicidae). Can. Entomol., 113: 13-20.

- Shemanchuk, J. A. & Humber, R. A., 1978. Entomophthora culicis (Phycomycetes: Entomophthorales) parasitizing black fly adults (Diptera: Simuliidae) in Alberta. Can. Entomol., 110: 253-256.
- Sigler, L., Frances, S. P. & Panter, C., 1987. Culicinomyces bisporalis, a new entomopathogenic Hyphomycete from larvae of the mosquito Aedes kochi. Mycologia, 79: 493-500.
- Smith, M. E., 1969. The Aedes mosquitoes of New England (Diptera: Culicidae). II. Larvae: Keys to instars, and two species exclusive of first instar. Can. Entomol., 101: 41-51.
- Soares, G. G., 1982. Pathogenesis of infection by the Hyphomycetous fungus, Tolypocladium cylindrosporum in Aedes sierrensis and Culex tarsalis (Dip.: Culicidae). Entomophaga, 27: 283-300.
- Soares, G. S. & Pinnock, D. E., 1984. Effect of temperature on germination, growth, and infectivity of the mosquito pathogen Tolypocladium cylindrosporum (Deuteromycotina; Hyphomycetes). J. Invertebr. Pathol., 43: 242-247.
- Sweeney, A. W., 1975a. The mode of infection of the insect pathogenic Culicinomyces in larvae of the mosquito Culex fatigans. Aust. J. Zool., 23: 49-58.

- Sweeney, A. W., 1975b. The insect pathogenic fungus Culicinomyces in mosquitoes and other hosts. Aust. J. Zool., 23: 59-64.
- Sweeney, A. W., 1978. The effects of temperature on the mosquito pathogenic fungus Culicinomyces. Aust. J. Zool., 26: 47-54.
- Sweeney, A. W., 1979a. Further observations on the host range of the mosquito fungus Culicinomyces. Mosq. News, 39: 140-142.
- Sweeney, A. W., 1979b. Infection of mosquito larvae by Culicinomyces sp. through anal papillae. J. Invertebr. Pathol., 33: 249-251.
- Sweeney, A. W., 1981. Prospect for the use of Culicinomyces fungi for biocontrol of mosquitoes. In M. Laird (Ed.), Biocontrol of medical and veterinary pests. Praeger, New-York, pp. 105-121.
- Sweeney, A. W., 1983. The time-mortality response of mosquito larvae infected with the fungus Culicinomyces. J. Invertebr. Pathol., 42: 162-166.
- Sweeney, A. W., 1985. The potential of the fungus Culicinomyces clavissporus as a biocontrol agent for medically important Dipterae. In M. Laird & J. W. Miles (Eds.), Integrated mosquito control methodologies. Vol. 2: Biocontrol and other innovative

components, and future directions. Academic Press, London, pp. 269-284.

Sweeney, A. W., Cooper, R. & Medcraft, B. E., 1983a. Field tests of the mosquito fungus Culicinomyces clavisporus against the Australian encephalitis vector Culex annulirostris. Mosq. News, 43: 290-297.

Sweeney, A. W., Inman, A. O., Bland, C. E. & Wright, R. G., 1983b. The fine structure of Culicinomyces clavisporus invading mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., 42: 224-243.

Sweeney, A. W. & Panter, C., 1977. The pathogenicity of the fungus Culicinomyces to mosquito larvae in a natural field habitat. J. Med. Entomol., 14: 495-496.

Sweeney, A. W. & Roberts, D. W., 1983. Laboratory evaluation of the fungus Culicinomyces clavisporus for control of Blackfly (Diptera: Simuliidae) larvae. Environ. Entomol., 12: 774-778.

Thaxter, R., 1888. The Entomophthoreae of the United States. Mem. Boston Soc. Nat. Hist., 4: 133-201.

Turlington, L. W., Woodward, D. L. & Colwell, A. E., 1986. Susceptibility of Clear Lake Gnat, Chaoborus astictopus, to the Hyphomycete

- fungus Tolypocladium cylindrosporum. Proc. California Mosq. Vector Control Assoc., 53: 98-100.
- Watts, D. M., Pantuwatana, S., Yuill, T. M., deFoliart, G. R., Thompson, W. H. & Hanson, R. P., 1975. Transovarial transmission of LaCrosse virus in Aedes triseriatus. Ann. N. Y. Acad. Sci., 266: 135-143.
- Webster, J., Sanders, P. F. & Descals, E., 1978. Tetraradiate aquatic propagules in two species of Entomophthora. Trans. Br. Mycol. Soc., 70: 472-479.
- Weiser, J. & Matha, V., 1988. Tolypin, a new insecticidal metabolite of fungi of the genus Tolypocladium. J. Invertebr. Pathol., 51: 94-96.
- Weiser, J. & Pillai, J. S., 1981. Tolypocladium cylindrosporum (Deuteromycetes, Moniliaceae) a new pathogen of mosquito larvae. Entomophaga, 26: 357-361.
- Wood, D. M., 1984. Clés des genres et des espèces de moustiques du Canada. Diptera: Culicidae. Ministère de l'agriculture du Canada, A-42-45, Ottawa.
- Wood, D. M., 1985. Diptères piqueurs du Canada qui s'attaquent à l'homme et au bétail. Ministère de l'agriculture du Canada, 1781/F, Ottawa.

Wood, D. M., Peterson, B. V., Davies, D. M. & Gyorkos, H., 1962. The black flies (Diptera: Simuliidae) of Ontario. Part. II: Larval identification, with descriptions and illustrations. Proc. Entomol. Soc. Ont., 93: 99-129.

World Health Organisation, 1985. Ten years of onchocerciasis control in West Africa. R 386, 85. 1B, Geneva.

ANNEXE A

COMPOSITION ET PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE.

Gélose Sabouraud-Dextrose, jaune d'oeuf et lait coagulé.

Composition

Solution A

Eau distillée.....	200 ml
Glucose	4 g
Extrait de levure	2 g
Agar	4 g

Solution B

Eau distillée	400 ml
Sabouraud-Dextrose	18 g

Lait 100 ml

Oeufs 6

Préparation

- Dissoudre les ingrédients des solutions A et B dans l'eau distillée par chauffage et agitation.

- Stériliser les solutions A et B et le lait, pendant 20 min. à 120° C. à l'autoclave.
- Stériliser les oeufs dans une solution 1:4 d'alcool 95% et d'hypochlorite de sodium (5%). Laisser tremper pendant 10 min.
- Enlever le jaune d'oeuf des oeufs à l'aide de pinces, et placer les dans un cylindre gradué stérile de 250 ml.
- Ajouter le lait stérile aux jaune d'oeuf et agiter.
- Verser le contenu du cylindre dans la solution A et agiter de nouveau.
- Verser la solution A dans la solution B. Agiter et verser dans les vases de Pétri.

Gélose "Pablum"

Composition

Céréale d'avoine (Pablum, Bristol-Meyers)	50 g
Agar	9 g
Eau distillée	500 ml

Préparation

- Mélanger la céréale d'avoine, l'agar et l'eau ensemble dans un ballon de 1 000 ml.
- Chauffer en agitant constamment jusqu'à ébullition.

- Stériliser à l'autoclave à 120⁰ C, pendant 20 min.
- Verser dans les vases de Pétri.

Gélose YpSs

Composition

Extrait de levure	4 g
Amidon	15 g
Phosphate dipotassique	1 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 L

Préparation

- Mélanger les 40, 5 g d'ingrédient dans l'eau distillée.
- Chauffer en agitant constamment, jusqu'à dissolution complète.
- Stériliser à l'autoclave pendant 20 min. à 120⁰ C.

Bouillon BEP

Composition

Peptone	5 g
Extrait de boeuf	3 g

Eau distillée 1 L

Préparation

- Mélanger les ingrédients dans l'eau distillée.
- Chauffer en agitant constamment, jusqu'à dissolution complète.
- Stériliser à l'autoclave pendant 20 min. à 120⁰ C.

Bouillon FM

Composition

Farine de maïs 20 g

Eau distillée 1 L

Préparation

- Mélanger la farine dans l'eau distillée.
- Chauffer jusqu'à ébullition.
- Laisser mijoter pendant 1 hre.
- Filtrer la solution avec une mousseline.
- Laisser reposer 15 min.
- Décanter et jeter le sédiment.
- Ramener le volume à 1 L avec l'eau distillée.
- Stériliser à l'autoclave pendant 20 min. à 120⁰ C.

ANNEXE B

LA FORMULE D'ABBOTT (1925).

Cette formule fut développée pour calculer l'efficacité d'un insecticide, dans les cas où il y a des mortalités dans les échantillons non-traités.

Soit x, le pourcentage de vivants dans l'échantillon témoin, et y le pourcentage de vivants dans l'échantillon traité, alors le pourcentage de mortalité pour le traitement est égale:

$$\frac{x - y}{x} \times 100 = \text{mortalité du traitement}$$